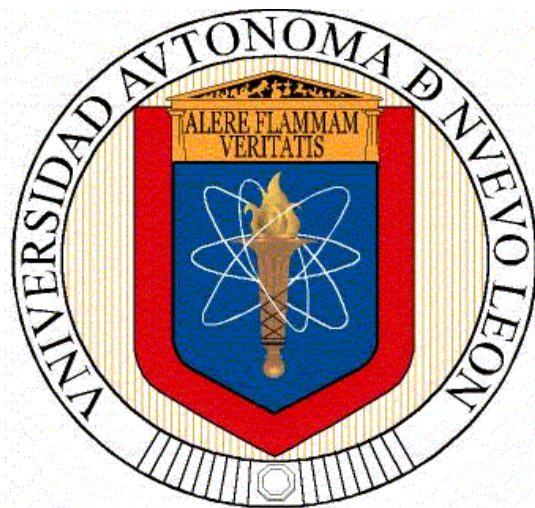


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL ESTRIADO EN LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR**

POR:

ROSA NELLY DÍAZ PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2015

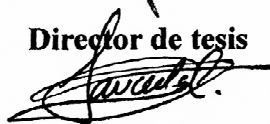
**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL ESTRIADO EN LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR**

Aprobación de tesis:



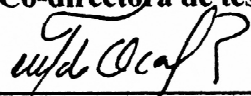
Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director de tesis



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Co-directora de tesis



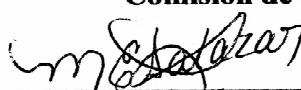
Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna

Comisión de tesis



Dr. C. Jaime García Juárez

Comisión de tesis



Dra. C. Martha Elizabeth Salazar Leal

Comisión de tesis

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL ESTRIADO EN LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR**

Presentado por:

M.C. ROSA NELLY DÍAZ PÉREZ

Este trabajo fue realizado en los Departamentos de Histología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adolfo Soto Domínguez y la Co-dirección de la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas.

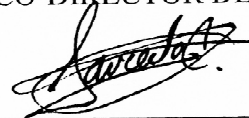
FIRMAS

DIRECTOR DE TESIS

A handwritten signature in black ink, consisting of a large circle with a diagonal line through it and some scribbles below, positioned above a horizontal line.

Dr. C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Saucedo', positioned above a horizontal line.

Dra. C. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS

Rosa Nelly Díaz Pérez

Fecha de graduación: Noviembre 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL ESTRIADO EN LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR

Número de páginas:

Área de estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio:

La ingestión accidental del fruto de *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*) en humanos y animales causa intoxicación crónica o aguda. La intoxicación aguda induce insuficiencia respiratoria que progresa rápidamente a la muerte. Los estudios en animales intoxicados con *Kh* describen lesiones en la corteza cerebral, cerebelo, médula espinal, el hipocampo y el núcleo caudado. Un modelo experimental con *Kh*, en la rata Wistar reproduce las fases de la intoxicación en los seres humanos, cuando no mueren. Con base en esto se analizaron las alteraciones histopatológicas en el cuerpo estriado en este modelo. Veinte ratas Wistar se dividieron en tres grupos (n: 5) intoxicados con fruto de *Kh* de acuerdo con el modelo descrito, un grupo de control (n: 5). Los animales fueron sacrificados en los días 48, 58 y 170 días después de la intoxicación. Se colectó el cerebro y se procesó por la técnica histológica convencional, o mediante la técnica de microscopía electrónica. Las secciones fueron teñidas con H & E, violeta de cresilo, Klüver-Barrera, y el azul de toluidina; y se realizó inmunomarcaje para las células gliales en el cuerpo estriado. Finalmente se analizaron las muestras, se realizaron análisis morfométricos y estadísticos.

Conclusiones y Contribuciones: Con los resultados obtenidos en este estudio se demostró que la *Kh* induce alteraciones morfológicas en el estriado, consistentes en hipercromía en las neuronas, desorganización de la vaina de mielina así como zonas de lisis axonal, sin datos de desmielinización. Además de activación y proliferación de células de la glía (gliosis), principalmente en los astrocitos; en el tiempo de paresia existe una disminución en las células de la microglia y un aumento en los oligodendrocitos. Cabe destacar que estas alteraciones persisten a pesar de la recuperación clínica de la rata. Este estudio describe las alteraciones histopatológicas en cuerpo estriado causados por la intoxicación crónica con fruto de *Kh* en ratas Wistar.

Firma del Director

Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

DEDICATORIA

A mis hijos con amor, por ser la luz de mi vida y la fuerza que me impulsa a superar todas las dificultades, son el amor que hace fuerte mi voluntad.

A mi amor por compartir tu vida conmigo, por hacerme sentir una mujer plena y amada, capaz para hacer de lo ordinario algo extraordinario.

A mis padres por siempre apoyarme y estar conmigo en los momentos difíciles, por creer en mí y haberme dado una educación a base de esfuerzo y sacrificio.

A mis hermanos por su gran ayuda y por estar conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme salud, amor y un ejemplo de fe.

A mis hijos, Adrian Alejandro y Elízabeth Andrea gracias por ser mi fuerza, Adrian Alejandro gracias por comprender en los momentos difíciles, por esperar siempre mi llegada y por brindarme todas esas sonrisas y besos llenos de amor, que me dieron la fuerza suficiente levantarme cada día y seguir adelante ante toda dificultad.

A Ricardo Ayala por creer en mí, por alentarme cada día a seguir sin claudicar, por todos esos abrazos de descanso y principalmente por darme la oportunidad de vivir en familia con amor y pensar que todo es posible.

A mis padres Alfredo y Rosa María, gracias haber sembrado en mi el deseo de superación gracias por enseñarme a ser valiente para enfrentar las adversidades y ser paciente para resolver los problemas, gracias por todos los consejos y por su gran apoyo en cada dificultad.

A mis hermanos Cecy, Fredy, Naty y Lety gracias por todas esas veces que preguntaron ¿que necesitas? y ¿en qué te puedo ayudar hermana? Gracias por estar conmigo en todos esos momentos difíciles

A Ricardo Damián y Aarón gracias por brindarme la felicidad de tenerlos como mi familia.

A el Dr. Julio Sepúlveda por ser siempre mi maestro y proponerme iniciar el camino de la investigación, por todos sus consejos y enseñanzas, le doy gracias a Dios porque haber tenido la oportunidad de aprender de usted, le debo mi formación como morfologa y espero que reciba este agradecimiento y Dios lo tenga en su gloria en un descanso perpetuo.

A la Dra. Gloria González y el Dr. Adrian Rosas por todo su apoyo y paciencia en la realización de este proyecto.

Al Dr. Adolfo Soto por aceptar este proyecto como mi director de tesis a pesar de las dificultades, aun cuando ya estaba iniciado y por toda la paciencia para seguir adelante, muchas gracias.

A la Dra. Odila Saucedo y el Dr. Roberto Montes de Oca por creer en mí, por todo su apoyo, cooperación y paciencia, por siempre buscar la manera en la que si se podían resolver las cosas, muchas gracias.

A el Dr. Jaime García, por su ayuda, por todas esas ocasiones que dejo pendientes sus actividades, para levantarse e ir conmigo al laboratorio a resolver mis dudas y por todo su apoyo, muchas gracias.

A la Dra. Martha Salazar por su apoyo en la orientación del modelo experimental.

Al Maestro Víctor Romero, por todo su apoyo, por estar al pendiente en el laboratorio orientándome y su ayuda para siempre tratar de buscar una solución a mis necesidades, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos del departamento de Histología por su apoyo y buenos consejos, en especial a Juan Manuel por su apoyo en el trabajo de inmunohistoquímica.

A Don Lorenzo, Nora, Rosy y Luis por su ayuda y apoyo en las actividades de laboratorio.

A Don Panchito por su ayuda y apoyo en el cuidado de los animales.

Abreviaturas

| | |
|-----------|--------------------------------|
| <i>Kh</i> | <i>Karwinskia humboldtiana</i> |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| PBS | Buffer de Fosfatos |
| H&E | Hematoxilina –Eosina |
| DAB | 3,3 Diaminobencidina |
| SNP | Sistema Nervioso Periférico |
| M | Molar |
| N | Normal |
| ml | Mililitro |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| KCl | Cloruro de Potasio |
| TBST | Tris-Buffer Salino+Tween |
| TRS | Target Recovery Solution |

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1 <i>Karwinskia humboltiana</i> | 1 |
| 1.1.1 Cuadro clínico de intoxicación por <i>Kh</i> | 1 |
| 1.1.2 Estudios químicos de <i>Kh</i> | 2 |
| 1.1.3 Intoxicación accidental con fruto de <i>Kh</i> en humanos..... | 2 |
| 1.1.4 Estudios experimentales en SNC realizados en animales intoxicados con fruto de <i>Kh</i> | 3 |
| 1.1.5 Modelo experimental de intoxicación crónica con el fruto <i>Kh</i> | 5 |
| 1.2 Ganglios basales | 6 |
| 1.2.1 Cuerpo estriado y Estriado..... | 6 |
| 1.2.1.1 Núcleo Lenticular..... | 6 |
| 1.2.1.2 Núcleo Caudado..... | 7 |
| 1.2.2 Conexiones al estriado | 8 |
| 1.2.2.1 Conexiones aferentes al estriado..... | 8 |
| 1.2.2.2 Conexiones eferentes del estriado..... | 8 |
| 1.2.3 Histología del estriado..... | 9 |
| 1.2.4 Tipos de neuronas en el cuerpo estriado..... | 9 |
| 1.3 Células de la Glía | 10 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.3.2 | Astrocitos..... | 10 |
| 1.3.2 | Oligodendrocitos..... | 11 |
| 1.3.3 | Células de la microglia..... | 11 |
| 1.4 | Justificación..... | 12 |
| 1.5 | Hipótesis de trabajo..... | 13 |
| 1.6 | Objetivo general..... | 14 |
| 1.7 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 2. | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 16 |
| 2.1 | Material..... | 16 |
| 2.1.1 | Origen de los reactivos..... | 16 |
| 2.1.2 | Material Biológico..... | 17 |
| 2.1.3 | Equipo..... | 17 |
| 2.1.4 | Recolección del fruto de <i>Kh</i> | 18 |
| 2.2 | Métodos..... | 18 |
| 2.2.1 | Grupos experimentales..... | 18 |
| 2.2.2 | Metodología..... | 19 |
| 2.2.3 | Análisis Morfológico..... | 21 |
| 2.2.3.1 | Análisis de cortes gruesos en parafina..... | 21 |
| 2.2.3.1.2 | Análisis Morfométrico | 22 |
| 2.2.3.2 | Análisis de cortes semifinos en resina epóxica..... | 22 |
| 2.2.3.2.1 | Análisis Morfométrico | 22 |

| | |
|--|----|
| 3. RESULTADOS | 23 |
| 3.1 Resultados | 23 |
| 3.1.1 Análisis Morfológico | 24 |
| 3.1.1.1 Grupo Control | 24 |
| 3.1.1.2 Grupo de Paresia | 25 |
| 3.1.1.3 Grupo de Parálisis | 25 |
| 3.1.1.4 Grupo de Recuperación | 26 |
| 3.1.2 Análisis Morfométrico | 27 |
| 3.1.2.1 Conteo de neuronas con la histoquímica de Violeta de Cresilo | 27 |
| 3.1.2.2 Conteo de axones en fascículos de cortes semifinos contrastados con Azul de Toluidina | 28 |
| 3.1.2.3 Conteo de las subpoblaciones de células de la glía con marcadores específicos por inmunohistoquímica | 28 |
| 4. DISCUSIÓN | 43 |
| 5. CONCLUSIONES | 47 |
| 6. PERSPECTIVAS | 48 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| APENDICES | 58 |
| APENDICE A | 58 |
| APENDICE B | 63 |
| APENDICE C | 65 |
| APENDICE D | 67 |
| APENDICE E | 68 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| APENDICE F..... | 70 |
| APENDICE G..... | 72 |
| APENDICE H..... | 74 |
| 8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA..... | 75 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 *Karwinskia humboldtiana*

La *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*), es popularmente conocida como: tullidora, capulín tullidor, cacachila, chanchanote, tuvii, pimientillo, coyotillo de Texas, etc. (Escobar y Nieto, 1965; Fernández Nava, 1992). Es un árbol o arbusto de 1 a 8 metros de altura, su fruto es del tamaño de un garbanzo, verde en sus inicios y de color violeta oscuro al momento de estar maduro, es carnosos, de cáscara fibrosa y con una semilla (Padrón, 1951; Arreola-Nava *et al.*, 2000).

1.1.1 Cuadro clínico de intoxicación por *Kh*

Cuando la ingesta del fruto de *Kh* ha sido abundante, se presenta una intoxicación aguda, con un cuadro de insuficiencia respiratoria y una rápida evolución hacia la muerte. Además, en animales de experimentación se presenta daño severo en órganos como: pulmón, hígado y riñón, en ausencia del cuadro de parálisis (Bermúdez *et al.*, 1986).

El cuadro de intoxicación crónica se produce 3 ó 4 semanas posteriores a la ingesta de fruto. Dependiendo de la cantidad de la ingesta accidental del fruto, tanto en el humano, como en animales, puede presentarse una intoxicación crónica o aguda. La intoxicación crónica inicia con una disminución de la fuerza en las extremidades inferiores, que asciende progresivamente y afecta también a las extremidades

superiores, para finalmente producir una parálisis, ascendente, progresiva y simétrica (Escobar y Nieto, 1965). Cuando el paciente sobrevive, la recuperación es gradual y de forma espontánea, en un periodo variable que puede ser hasta de 1 año después, de la ingesta del fruto (Escobar y Nieto, 1965; Aguilar y Zolla, 1982).

1.1.2 Estudios químicos de *Kh*

Del fruto de *Kh* se han aislado antracenonas fenólicas biológicamente activas (Dreyer *et al.*, 1975; Waksman *et al.*, 1989). Mediante análisis fisicoquímicos se logró determinar la estructura química de 4 compuestos con actividad deletérea, tales compuestos se nombraron en base a su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544 (Dreyer *et al.*, 1975). Estudios en animales de experimentación demostraron que el compuesto T-544 es responsable de los efectos neurológicos, el T-514 de las lesiones de pulmón, hígado y miocardio, el T-496 únicamente produce diarrea y el T-516 que hasta el momento no se conoce su actividad específica (Bermúdez *et al.*, 1992). Algunas de estas toxinas, también están presentes en las hojas y raíz de esta planta (Domínguez *et al.*, 1976).

1.1.3 Intoxicación accidental con fruto de *Kh* en humanos

El primer reporte de la intoxicación por la ingesta accidental del fruto de *Kh*, fue escrito por Clavijero en el siglo XVIII (Clavijero, 1789). Posteriormente Castillo Nájera describe casos de parálisis observados en Puebla en 1918, entre los elementos del ejército de la División del Norte (Castillo Nájera, 1920). Padrón, en 1951 describió el cuadro clínico de la intoxicación, de acuerdo a las observaciones realizadas en 6 niños intoxicados (Padrón, 1951).

1.1.4 Estudios experimentales en SNC realizados en animales intoxicados con fruto de *Kh*

Se han realizado diversas investigaciones para esclarecer el daño causado por el fruto de *Kh*. Padrón en 1951, en un estudio experimental realizado en rata blanca y conejo, administró de 5 a 10g de semilla pulverizada en una dosis única, lo que causó la muerte para la rata. Con una dosis de 3 a 5g se logró reproducir el cuadro de parálisis que se observa en humanos en un periodo de 2 a 4 días posteriores a la administración, éste resultado se logró también con 2 dosis diarias de 2 a 3g durante 5 días (Padrón, 1951).

Basándose en estas condiciones experimentales, en 1956 Padrón y Velázquez produjeron el cuadro clínico de parálisis en conejos. Se realizó el examen histopatológico de los animales y se observó hipercromasia, con disminución del volumen y el número de neuronas en el asta anterior de médula espinal, algunas neuronas presentaron datos morfológicos de cromatólisis. También se observó lesión difusa en las células de Purkinje en cerebelo, y lesión neuronal difusa en los núcleos del puente y corteza cerebral (Padrón y Velázquez, 1956).

Escobar y Nieto en 1965, realizaron un estudio experimental en gato y rata blanca, que recibieron una dosis de 5g y 1g de papilla respectivamente de *Kh* administrada vía oral. Se mostró el cuadro de parálisis de 6-8 días posteriores a la ingesta, y al presentar la cuadriplejía los animales manifestaron signos de dificultad respiratoria. Además se realizó el análisis histopatológico de los animales, y se observaron lesiones neuronales localizadas en las astas anteriores de médula espinal, con hipercromasia y cromatólisis. En los animales gravemente afectados, se observaron vacuolas en el citoplasma y picnosis del núcleo, la glía satélite mostró discreta proliferación sobre todo alrededor de las neuronas más afectadas, con degeneración en los troncos nerviosos tanto en porciones proximales y distales (Escobar y Nieto, 1965). En este estudio también se reportó lesión difusa en las células de Purkinje de

cerebelo, coincidiendo con lo reportado por Padrón y Velázquez en 1956 (Escobar y Nieto, 1965).

Charlton y Pierce en 1970, en un estudio experimental realizado en gatos, administraron 0.04% a 0.05% del peso corporal por día como dosis altas, y 0.01% del peso corporal por día como dosis bajas por un periodo variable de intervalos de 3, 6, 7, 13, 66 y 69 días. En este estudio como ya se ha descrito en estudios previos, también se observó el daño a la célula de Purkinje en cerebelo, además de distrofia axonal. En médula espinal se observó daño neuronal en sustancia gris, desmielinización segmentaria y datos de degeneración walleriana, que fue más acentuada a dosis altas y en la porción distal del cordón espinal (Charlton y Pierce, 1970).

Ortiz *et al.*, en 1991, realizaron un estudio en rata Wistar con 2g de fruto administrado vía oral, en tiempos de 6, 12, 48 y 72 hrs. Se analizaron corteza motora de cerebro, hipocampo y núcleo caudado, y se observaron neuronas con hipercromasia y datos de gliosis (Ortiz *et al.*, 1991).

En resumen, en animales intoxicados con fruto de *Kh*, se ha descrito lesión neuronal en diversas áreas del SNC como son: corteza cerebral, cerebelo y médula espinal (Padrón y Velázquez 1956, Escobar y Nieto, 1965, Charlton y Pierce, 1970). Al igual en hipocampo y núcleo caudado (Ortiz *et al.* 1991). Se ha propuesto que la necrosis neuronal es secundaria a degeneración periférica de las fibras nerviosas (Izquierdo y Nieto, 1965). Es importante señalar, que en todos los estudios experimentales de intoxicación en animales existe una amplia diversidad en cuanto a especie, vías de administración, y las dosis empleadas, sin embargo, todos estos estudios coinciden con las lesiones histopatológicas ya descritas.

1.1.5 Modelo experimental de intoxicación crónica con el fruto *Kh*

El primer modelo experimental de la intoxicación, que logró reproducir en la rata todas las etapas de la intoxicación observadas en el humano, fue descrito hasta el 2006 por Salazar *et al.* Para el desarrollo de este modelo se intoxicaron ratas Wistar con el fruto seco, molido, tamizado y administrado vía oral con sonda orogástrica, con una dosis inicial de 1.5g/Kg y 4 dosis subsecuentes de 0.5g/kg los días 3, 7, 10 y 14 a partir del inicio de la intoxicación. El análisis histopatológico mostró desmielinización y degeneración axonal en nervio periférico (Salazar *et al.*, 2006), coincidiendo con lo descrito en estudios previos de animales intoxicados con el fruto de *Kh*.

En este modelo, Becerra *et al.*, en 2009 realizaron un estudio morfológico del SNC (corteza motora, cerebelo, médula espinal, núcleo vestibular y tracto corticopontocerebeloso). Se describió en neuronas del núcleo vestibular datos de cromatólisis e hipercromasia desde la etapa sin paresia, con un decremento de la hipercromasia en la etapa de parálisis, y una apariencia semejante al grupo control en la etapa de recuperación. También se observó daño axonal con una pérdida del trayecto lineal, que fue progresiva a lo largo de las etapas con una reorganización de los tractos en la etapa de recuperación, estas lesiones son representativas de las áreas estudiadas (Becerra *et al.*, 2009).

A diferencia del daño descrito en sistema nervioso periférico (Salazar *et al.*, 2006), en SNC no se observó alteración en la mielina (Becerra *et al.*, 2009). En corteza motora, se observaron algunas neuronas con pérdida de la afinidad tintorial y citoplasma eosinófilo. En cerebelo se observaron neuronas con picnósis, datos de cromatólisis y a partir de la etapa de parálisis, se describió una aparente disminución de las células de Purkinje y datos de gliosis (Becerra *et al.* 2009). Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Padrón y Velázquez (1956), Escobar y Nieto (1965), y Charlton y Pierce (1970).

1.2 Ganglios basales

Los ganglios basales son masas nucleares subcorticales simétricas derivadas del telencéfalo, que se encuentran situadas en la parte inferior de los hemisferios cerebrales. Están compuestos por: el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido y la amígdala (Haber y Johnson, 2004).

1.2.1 Cuerpo estriado y Estriado

El cuerpo estriado es un núcleo constituido por el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido. Los dos primeros núcleos configuran la región del estriado, debido a que es cruzado por las fibras mielínicas que le confieren esta apariencia, es considerado el centro de las aferencias corticales de los ganglios basales (Haber y Johnson, 2004). Siendo el estriado la región de interés en el presente trabajo.

Existe una clasificación del cuerpo estriado basada en los niveles de antigüedad filogenética en que se desarrollan dichas estructuras. El arquiestriado está constituido por la amígdala, paleoestriado que comprende el globo pálido, y neoestriado formado por el núcleo caudado y el putamen (Haber y Johnson, 2004).

1.2.1.1 Núcleo Lenticular

Este núcleo está compuesto por: el putamen y el globo pálido. Es semejante a una lente biconvexa, está subdividido en tres partes por dos laminas medulares, lateral y medial formadas por sustancia blanca, el segmento lateral es el putamen y los dos segmentos mediales el globo pálido (Haber y Johnson, 2004).

La superficie lateral del núcleo lenticular corresponde a la cápsula externa, medialmente está en relación con la capsula interna. Hacia su parte ventral se hallan las fibras del segmento sublenticular de la capsula interna y rostralmente a éstas, las de la comisura anterior, que se dirigen al lóbulo temporal del cerebro (Haber y Johnson, 2004).

1.2.1.2 Núcleo Caudado

Está compuesto por una cabeza que se halla por delante del foramen interventricular y se continua, casi sin transición, hasta la cola delgada que desciende a la prolongación temporal del ventrículo. En su parte terminal, la cola está formada por pequeñas masas discontinuas de sustancia gris que llegan hasta la región basolateral de la amígdala, con la que se continúa (Haber y Johnson, 2004).

En la parte basal y medial de la cabeza, que se localiza por arriba de la sustancia perforada anterior, se encuentra el *núcleo accumbens septi*, que representa la extensión medial de esta parte del núcleo caudado. En la prolongación frontal y cuerpo del ventrículo, el núcleo caudado está en relación medialmente con la estría terminal y la vena tálamo estriada que lo separa del tálamo. En su parte rostro lateral, la cabeza del caudado se une a la porción anterior del putamen, estando ambos núcleos separados en el resto de su extensión, por las fibras que pasan por el segmento anterior o lenticulo-caudado de la cápsula interna. En conjunto, el núcleo caudado presenta una concavidad anterior en la que se halla el tálamo (Haber y Johnson, 2004).

1.2.2 Conexiones al estriado

1.2.2.1 Conexiones aferentes al estriado

a) Conexiones corticoestriadas: En la actualidad se han demostrado fibras que se originan en todas las regiones corticales y se proyectan en forma somatotópicamente organizada al estriado. La corteza somatosensorial proyecta hacia la región dorsolateral del cuerpo estriado, la corteza visual a la región dorso medial, y la corteza auditiva, a la región medial del mismo (Haber y Johnson, 2004).

b) Conexiones tálamoestriadas: El estriado recibe fibras de los núcleos intralaminares, del centro mediano y dorso medial del tálamo. Terminan tanto en el caudado como en el putamen. Se ha postulado que las proyecciones del centro mediano al tálamo se hacen de manera somatotópicamente organizada (Haber y Johnson, 2004).

c) Conexiones nigroestriadas: Constituyen unas de las más importantes vías aferentes del putamen, están constituidas por fibras que se originan de las partes compacta y reticular de la sustancia negra, ascienden al subtálamo y pasan entre las fibras de la cápsula interna en el putamen, aunque algunas llegan al caudado y al globo pálido (Haber y Johnson, 2004).

1.2.2.2 Conexiones eferentes del estriado

El núcleo caudado y el estriado están relacionados por las fibras internucleares. La mayor proyección eferente del estriado se hace al globo pálido, al cual llegan fibras tanto del caudado como del putamen, aunque la mayoría proviene de este último. Se ha demostrado una organización somatotópica precisa en la proyección estríopalidal. El segmento lateral del globo pálido recibe fibras de la parte externa del estriado y el segmento medial de la parte correspondiente del caudado y putamen (Haber y Johnson, 2004).

1.2.3 Histología del estriado

Es un núcleo de sustancia gris, donde se observan neuronas y células de la glía entre el neurópilo, además este núcleo es atravesado por múltiples fascículos de axones mielinizados en diversas direcciones, correspondientes a las proyecciones nerviosas aferentes y eferentes de otras áreas del SNC, entre ellas la corteza cerebral (Haber y Johnson, 2004).

1.2.4 Tipos neuronales en el cuerpo estriado

Son de dos tipos: las neuronas de proyección y las interneuronas. Las neuronas de proyección son neuronas multipolares, en sus proyecciones presentan múltiples espinas por lo que también son denominadas neuronas espinosas; se subclasifican en: tipo 1, que representan el 90% de la población neuronal y tipo 2, que representan menos del 1%. Las interneuronas también son neuronas multipolares, carecen de espinas por lo que se denominan no espinosas, se subclasifican en tipo 1, que representan menos del 5%, tipo 2 que representan el 1% y tipo 3, que una no están bien caracterizadas (Haber y Johnson, 2004).

La mayoría de las aferencias de las neuronas espinosas tipo 1, son derivadas de corteza, tálamo y tallo encefálico. Las fibras de la corteza, proyectan principalmente a dendritas espinosas formando terminales asimétricas, glutaminérgicas y excitatorias. (Haber y Johnson, 2004).

1.3 Células de la Glía

Las células de la glía, tienen como función proporcionar soporte estructural a las neuronas y mantener las condiciones locales para el adecuado funcionamiento neuronal, con un soporte también metabólico, manteniendo las concentraciones adecuadas de iones y neurotransmisores (Kierszenbaun y Tres, 2012). A diferencia de las neuronas, las células de la glía no generan, ni transmiten potenciales de acción. Están constituidas por astrocitos, oligodendrocitos y células de la microglia (Kierszenbaun y Tres, 2012).

1.3.1 Astrocitos

Son las células más numerosas, se encuentran en el SNC y se dividen en dos categorías: fibrosos y protoplásmicos. Los astrocitos fibrosos, se localizan en la sustancia blanca, poseen prolongaciones delgadas y alargadas con escasas ramificaciones. Los astrocitos protoplásmicos, se encuentran principalmente en la sustancia gris, poseen prolongaciones más cortas con numerosas ramificaciones arborescentes. Las prolongaciones de los astrocitos terminan en unas prolongaciones llamados pies terminales, que están en íntimo contacto con los capilares y constituyen la glía limitante como parte de la barrera hematoencefálica, representan una protección frente a agentes nocivos presentes en la circulación general. Es posible la identificación de estas células mediante el marcaje de los filamentos intermedios constituidos por la proteína fibrilar glial ácida (GFAP). Los núcleos de los astrocitos son grandes, ovalados y se tiñen de color claro (Kierszenbaun y Tres, 2012).

1.3.2 Oligodendrocitos

Son células más pequeñas que los astrocitos, sus núcleos son irregulares y se tiñen densamente, tienen un aparato de Golgi y mitocondrias abundantes y numerosos microtúbulos. Su función consiste en la formación de la vaina de mielina alrededor del axón desde sus segmentos iniciales hasta su porción terminal, proporcionan un aislante que mejora la conducción del impulso nervioso (Kierszenbaun y Tres, 2012).

1.3.3 Células de la microglia

Esta población representa el 12% de las células del encéfalo, se localizan predominantemente en la sustancia gris y son más abundantes en los ganglios basales. De manera fisiológica se encuentran en un estado de reposo y se distinguen por un núcleo triangular y prolongaciones escasas y largas poco ramificadas, en estado activo adquieren una morfología ameboide y aumento en expresión de receptores de superficie como CD14 como consecuencia de daño cerebral ya que tienen una función inmunitaria, también participan en el retiro de desechos tóxicos y propician la supervivencia neuronal mediante la liberación de factores tróficos y antiinflamatorios (Kierszenbaun y Tres, 2012).

1.4 Justificación

A la fecha está descrito que la intoxicación por el fruto de *Kh* produce un cuadro de parálisis y alteraciones morfológicas en la vía motora del SNC.

Debido a la importancia del estriado como centro integrador que recibe las aferencias de la corteza cerebral, es de interés evaluar si la intoxicación por *Kh* cursa con alteraciones morfológicas en el estriado.

1.5 Hipótesis de trabajo

La intoxicación crónica causada por el fruto de *Kh* en rata Wistar, cursa con alteraciones morfológicas en el estriado.

1.6 Objetivo general

Determinar si la intoxicación crónica por *Kh* induce alteraciones morfológicas en el estriado de ratas Wistar.

1.7 Objetivos específicos

1. Analizar la morfología de los cuerpos neuronales de el estriado de ratas intoxicadas.
2. Analizar la morfología de los fascículos axonales del estriado de ratas intoxicadas con *Kh*.
3. Determinar si la intoxicación induce cambios en las células de la glía.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de la más alta calidad en el reactivo analítico. En todos los casos se utilizó agua desionizada y ultrapura (sistema Mili-Q de Milipore).

Los reactivos utilizados en la Técnica de Microscopía Electrónica y de Luz fueron: Paraformaldehído, glutaraldehído, ácido pícrico, tetraóxido de osmio, resinas epóxicas de media hidratación, cacodilato de sodio, nitrato de uranilo, azul de toluidina.

Los moldes para la inclusión y material quirúrgico fino con puntas de teflón, se obtuvieron de Electron Microscopy Sciences. Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y acetona de Analytika Tecnología Industrial Química. Cloruro de sodio, fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de potasio de la marca Sigma Chemical Company.

El vidrio para preparar las cuchillas se obtuvo de Pelco International (Redding CA, EUA). Recipientes de vidrio, vasos de precipitado, probetas, navajas, hojas de bisturí, guantes de látex, jeringas, agujas, puntillas para micropipetas, pipetas Pasteur, tubos Falcon y tubos Eppendorf estériles.

El Sistema Envision de Dako Cytomation Inc[®], anticuerpos específicos anti-S100, y GFAP de Dako Cytomation Inc[®] y anti-IBA-1 de Abcam.

2.1.2 Material Biológico

Se utilizaron ratas Wistar hembras, adultas jóvenes, con un peso de 198g \pm 25g. Todas las ratas se obtuvieron del bioterio del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.1.3 Equipo

Fotomicroscopio Nikon Eclipse 50i con cámara Nikon Digital Sight DS-2Mv.

Ultramicrotomo RMC modelo MTX.

Preparador de cuchillas de vidrio LKB Bromma modelo 7800 KnifeMaker

Placa caliente Corning Hot Plate Stirrer modelo PC-315

Campana de extracción.

Estufa eléctrica Equiphos S.A.

Congelador -20° C Torrey modelo CV-14.

Refrigerador Supermatic modelo 0803.

Balanza analítica A&D Company Limited.

Juego de pipetas semiautomáticas Techware. Sigma-Aldrich.

Estuche de disección Hergon Premium.

Bomba de Perfusión

2.1.4 Recolección del Fruto de *Kh*

Se recolectó el fruto de *Kh* durante el mes de abril en la zona de Potrero Chico, en Hidalgo, Nuevo León. Se dejó secar, luego se molió y tamizó hasta la criba del número 100.

2.2 Métodos

Los experimentos se realizaron acorde a las Guías Internacionales del Uso Apropriado de Animales de Experimentación, y acorde a la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de las Técnicas y Especificaciones de Producción y El Cuidado y Uso de Laboratorio de Animales (SAGARPA, 1999). El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UANL en Monterrey, Nuevo León, México.

2.2.1 Grupos Experimentales

Se utilizaron ratas Wistar hembras, adultas jóvenes, con un peso de $198\text{g} \pm 25\text{ g}$. Los animales se mantuvieron en una dieta estándar de laboratorio con agua *ad libitum* y condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Las ratas se intoxicaron con fruto seco, molido y tamizado de *Kh* en suspensión, disuelto en 1 mL de agua, y administrado por medio de sonda orogástrica, con una dosis inicial de 1.5g/Kg y 4 dosis subsecuentes de 0.5g/kg los días 3, 7, 10 y 14 a partir del inicio de la intoxicación.

Se realizó la observación de los animales con el seguimiento de las manifestaciones clínicas descritas para la intoxicación (Fig. 3). Los animales (n=24) se dividieron en 3 grupos experimentales de 5 ratas cada uno: a) grupo de paresia,

sacrificado a los 48 días, b) grupo de parálisis, sacrificado a los 58 días, y c) grupo de recuperación sacrificado a los 112 días. El grupo control absoluto consta de 9 ratas que recibieron únicamente agua, de las cuales se sacrificaron 3 ratas en los tiempos experimentales antes descritos (Fig. 1).

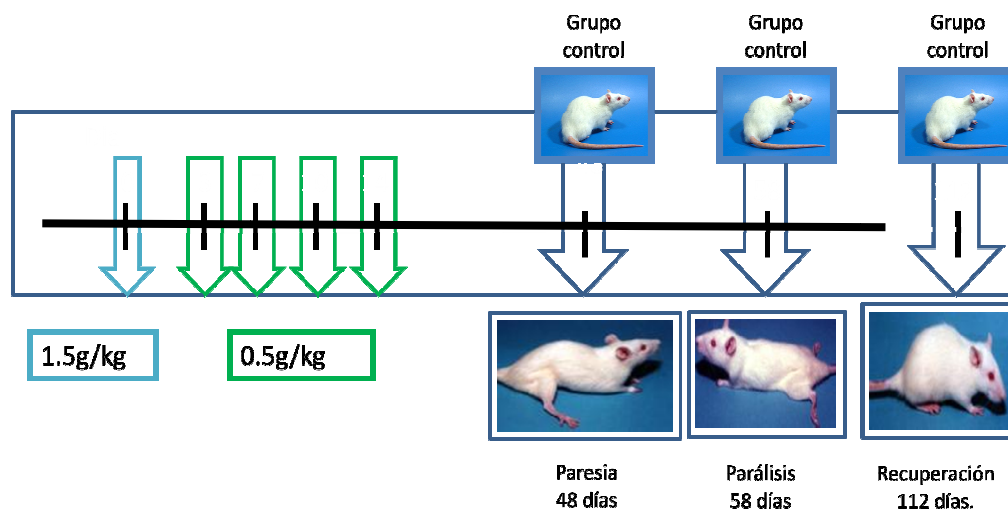


FIGURA 1. Esquema de intoxicación con *Kh*.

2.2.2 Metodología

Para cada tiempo y condición experimental, se sacrificó a cada rata con una dosis de 80 mg/kg de peso de pentobarbital vía intraperitoneal (en los casos donde la dosis no fue suficiente, se repitió a 80 mg/kg de peso).

Posterior a la administración del pentobarbital se examinó la falta de reflejo corneal, que indica la sedación del animal y se sujetó a una base de corcho, en seguida se realizó asepsia con torundas con etanol al 70% y se disecó el área torácica para exponer el corazón. Se realizó una punción cardiaca con un yelco número 14 desde la punta del ventrículo izquierdo dirigida hacia la base del corazón, para iniciar la perfusión con 150 ml de buffer de fosfatos (PBS) con una bomba peristáltica para regular la velocidad de entrada del líquido a los tejidos, y evitar al máximo el daño en la arquitectura de los mismos. Una vez iniciado el flujo se realizó una incisión en la

aurícula derecha para la salida de la sangre del sistema, este proceso tuvo una duración de aproximadamente 15 min a una velocidad de 35+. Después, se bombeó un volumen de 150 mL de paraformaldehído al 4% bajo las mismas condiciones de velocidad y tiempo. Al terminar la perfusión se disecó el encéfalo.

Se cortó el encéfalo de manera sagital por la línea media para separar los dos hemisferios. El hemisferio derecho se procesó por la técnica histológica de inclusión en parafina (APENDICE B). Del hemisferio izquierdo se identificó y se disecó el cuerpo estriado y se obtuvo para procesar por microscopia electrónica (APENDICE G).

Estrategia experimental



FIGURA 2. Estrategia experimental

2.2.3 Análisis Morfológico

2.2.3.1 Análisis de cortes gruesos en parafina

A partir de los bloques de parafina de los grupos de estudio y grupos control, se realizaron cortes de 5 μm de espesor, que se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) (APÉNDICE C) para confirmar la zona de interés por medio de las coordenadas del Atlas de Paxinos (Paxinos *et al.*, 2005).

También, se realizaron cortes de 10 μm para la histoquímica de Violeta de cresilo (APÉNDICE D), esta técnica permitió el estudio de los cuerpos neuronales. Con la histoquímica de Klüver-Barrera para el estudio la mielina (APÉNDICE E). Estos cortes se analizaron con un fotomicroscopio Nikon Eclipse 50i y se obtuvieron imágenes digitales

Por otra parte, se realizó la inmunohistoquímica en cortes de 4 μm de espesor de los bloques parafina de los grupos de estudio (APÉNDICE F). Los cortes se incubaron con anticuerpos específicos, anti-S100 (dilución 1:200) para identificación de oligodendrocitos, anti-GFAP (dilución 1:200) para identificación de astrocitos fibrosos, y anti-IBA-1 (1:200) para identificación de células de la microglia. Como medio de detección se utilizó el Sistema Envision y se evidenció la positividad con 3,3'Diaminobencidina (DAB), además se contrastó con hematoxilina de Mayer's. Como control negativo se omitió el anticuerpo primario. Los cortes se analizaron con el fotomicroscopio Nikon Eclipse 50i y se obtuvieron imágenes digitales.

Todas la laminillas utilizadas para el montaje de los cortes, se prepararon con Poly-L-Lisina para evitar el desprendimiento del tejido (APÉNDICE A).

2.2.3.1.2 Análisis Morfométrico

En los cortes de histoquímica con Violeta de Cresilo, se realizó un conteo de neuronas en 3 laminillas por animal y 8 campos a 40x por laminilla, para un total de 24 campos por rata. Esta misma metodología se empleó para el conteo de cada una de las poblaciones de las células de la glía en los cortes analizados con inmunohistoquímica.

2.2.3.2 Análisis de cortes semifinos en resina epóxica

A partir de los bloques polimerizados de resina epóxica se realizaron cortes semifinos de 350 nm de grosor, los cuales se tiñeron con Azul de Toluidina (APÉNDICE F) y se analizaron con el fotomicroscopio Nikon Eclipse 50i y se obtuvieron imágenes digitales.

2.2.3.2.1 Análisis Morfométrico

En estos cortes también se realizó el conteo de 100 axones en cinco campos a 100x por laminilla, para un total de 500 axones por rata, estos axones se clasificaron en gruesos y delgados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Resultados

Se analizó el cuadro clínico de las ratas intoxicadas con *Kh* (Fig. 3). Como primeros signos se observaron piloerección, dificultad respiratoria de leve intensidad y debilidad, en la etapa sin paresia, posteriormente durante la etapa de paresia se observó, ataque el estado general así como alteraciones en la marcha, con atrofia muscular y deformidad espinal, la parálisis de las extremidades se presentó en el día 58 y el signo de mano en garra; finalmente en la etapa de recuperación una de las ratas desarrollo dificultad respiratoria intensa y falleció, mientras que en el resto, desapareció la neuropatía y mejoró el estado general



| Manifestaciones Clínicas | Sin Paresia | Paresia | Parálisis | Recuperación |
|---------------------------|-------------|---------|-----------|--------------|
| Piloerección | + | + | + | + |
| Dificultad respiratoria | + | + | + | - |
| Debilidad | + | + | + | - |
| Alteraciones en la marcha | - | + | + | - |
| Atrofia muscular | - | + | + | - |
| Ataque al estado general | - | + | + | - |
| Deformidad espinal | - | + | + | - |
| Mano en garra | - | - | + | - |
| Parálisis | - | - | + | - |
| Desaparece polineuropatía | - | - | - | + |
| Mejora del estado general | - | - | - | + |

FIGURA 3. Cuadro de las manifestaciones clínicas de la intoxicación con *Kh*.

En los cortes de estriado de grupos control y experimentales se confirmó la correcta disección del estriado, mediante la tinción de H&E (Fig. 4).

3.1.1 Análisis Morfológico

3.1.1.1 Grupo Control

Con la histoquímica de Violeta de Cresilo, se identificaron neuronas de aspecto normal con forma redondeada, citoplasma escaso de tinción pálida y núcleo redondo, claro con cromatina dispersa y nucléolo prominente; así como núcleos más pequeños que corresponden a las células de la glía con escaso citoplasma y núcleo con predominio de cromatina compacta de tinción densa (Fig. 5A).

Con la histoquímica de Klüver-Barrera se destacaron los fascículos de axones mielinizados con diversos patrones de corte predominando los cortes transversales. Los axones se observaron con una tinción uniforme de la mielina de color azul, además se observó el neurópilo de aspecto organizado rodeando neuronas de aspecto normal ya descritos (Fig. 6A).

En los cortes semifinos, contrastados con Azul de toluidina se observaron fascículos con axones de distinto calibre de características normales, con aspecto organizado de la vaina de mielina (Fig. 7A).

Con inmunohistoquímica se identificaron las subpoblaciones de las células de la glía de color pardo, se observaron astrocitos como células estrelladas con proyecciones largas y delgadas (Fig. 8A); los oligodendrocitos con núcleos redondeados y algunas proyecciones (Fig. 9A), y las células de la microglia con núcleo triangular y algunas proyecciones (Fig. 10A), todas de aspecto normal.

3.1.1.2 Grupo de Paresia

En este grupo, con Violeta de cresilo se identificaron neuronas de aspecto normal ya descritas, alternando con neuronas de aspecto hipercrómico y aparente disminución del tamaño (Fig. 5B).

Con Klüver-Barrera se destacaron los fascículos de axones mielinizados con algunas vesículas claras en su interior y neurópilo de aspecto organizado. Se observaron también neuronas normales alternando con neuronas hipercrómicas disminuidas de tamaño coincidiendo con lo observado con Violeta de Cresilo (Fig. 6B).

En los cortes semifinos, se observaron fascículos de aspecto normal con un aparente aumento en el calibre en los axones, en la vaina de mielina predomina un aspecto organizado sin embargo algunas vainas se observaron desorganizadas con un aspecto deshilachado (Fig. 7B).

Con inmunohistoquímica se observó un aparente aumento en la población de astrocitos de morfología normal ya descrita (Fig. 8B), también se observó un aumento en los oligodendrocitos (Fig. 9B), y la microglia muestran una morfología normal con una aparente disminución en este tiempo experimental (Fig. 10B).

3.1.1.3 Grupo de Parálisis

Con Violeta de cresilo se observó daño neuronal importante con predominio de neuronas hipercrómicas, con núcleo picnótico y disminución del tamaño, también se observaron neuronas de aspecto normal ya descritas en menor número (Fig. 5C).

Con Klüver-Barrera se observaron los fascículos de axones con aparente aumento de vesículas de aspecto claro en la mielina de color azul, neurópilo de aspecto desorganizado, así como un aumento de neuronas dañadas de aspecto hipercrómico (Fig. 6C).

En los cortes semifinos se observaron algunos axones con aparente aumento del calibre y adelgazamiento de la vaina de mielina con aspecto desorganizado, se observaron también zonas de lisis axonal (Fig. 7C).

Con inmunohistoquímica se observó mayor aumento en la población de astrocitos de morfología normal ya descrita (Fig. 8C), los oligodendrocitos (Fig. 9C), y la microglia muestran una morfología normal (Fig. 10C), sin aumento aparente.

3.1.1.4 Grupo de Recuperación

Con Violeta de cresilo se identificó persistencia del daño descrito previamente con predominio de neuronas hipercrómicas (Fig. 5D).

Con Klüver-Barrera se observaron fascículos de axones con algunas vesículas claras en la mielina de color azul, neurópilo de aspecto desorganizado, así como el predominio de las neuronas dañadas de aspecto hipercrómico (Fig. 6D).

En los cortes semifinos se observó un aparente aumento en el calibre de los axones y una franca desorganización de las vainas de mielina (Fig. 7D).

Con inmunohistoquímica se observó una persistencia del aumento en la población de astrocitos de morfología normal ya descrita (Fig. 8D), los oligodendrocitos (Fig. 9D), y la microglia muestran una morfología normal (Fig. 10D), sin aumento aparente.

3.1.2 Análisis Morfométrico

3.1.2.1 Conteo de neuronas con la histoquímica de Violeta de Cresilo

En todos los grupos experimentales, se identificó una disminución progresiva de las neuronas de aspecto normal en relación al grupo control, así como un aumento progresivo de las neuronas dañadas de aspecto hipercrómico, predominando esta población en el grupo de recuperación. Las neuronas con cromatólisis fueron escasas.

El porcentaje de neuronas normales en el grupo control fue de $98.58\% \pm 3.50$, en el grupo de paresia $90.89\% \pm 5.25$, en el grupo de parálisis $80.45\% \pm 3.02$, y en el grupo de recuperación $19.39\% \pm 6.34$.

El porcentaje de neuronas hipercrómicas en el grupo control fue de 1.09 ± 0.08 , en el grupo de paresia $6.68\% \pm 2.27$, en el grupo de parálisis $19.02\% \pm 4.72$, y en el grupo de recuperación $80.60\% \pm 7.30$.

El porcentaje de neuronas con cromatólisis en el grupo control fue de $0.32\% \pm 0.04$, en el grupo de paresia $2.41\% \pm 1.31$, en el grupo de parálisis $0.52\% \pm 0.18$, y en el grupo de recuperación $0\% \pm 0$.

Todos los grupos intoxicados con el fruto de *Kh* mostraron una diferencia estadísticamente significativa con una p igual a 0.0001 respecto al grupo control. En neuronas normales el grupo control obtuvo una p igual a 0.02 respecto al grupo de paresia, respecto al grupo de parálisis una $p < 0.0001$ y respecto al grupo de recuperación una $p < 0.0001$. En neuronas hipercrómicas el grupo control obtuvo una p igual a 0.005 respecto al grupo de paresia, respecto al grupo de parálisis una p igual a 0.001 y respecto al grupo de recuperación la una $p < 0.0001$. En neuronas con cromatólisis el grupo control obtuvo una p igual a 0.02 respecto al grupo de paresia, respecto al grupo de parálisis la p igual a 0.05 y respecto al grupo de recuperación la una $p < 0.0001$ (Gráfica 1).

3.1.2.2 Conteo de axones en fascículos de cortes semifinos contrastados con Azul de Toluidina

En los cortes semifinos de ratas intoxicadas, se observó mayor número de axones delgados respecto a los axones gruesos. El porcentaje de axones delgados en el grupo control fue de $77.84\% \pm 6.42$, en el grupo de paresia $67.40\% \pm 2.98$, en el grupo de parálisis $69.90\% \pm 5.58$ y en el grupo de recuperación $80.46\% \pm 4.11$. El porcentaje de axones gruesos en el grupo control fue de 21.24 ± 6.56 , en el grupo de paresia $32.72\% \pm 2.92$, en el grupo de parálisis $29.85\% \pm 5.28$, y en el grupo de recuperación $26.05\% \pm 4.11$. Se observó una disminución en el porcentaje de axones delgados del grupo control respecto a los grupos de paresia y de parálisis, esta disminución fue estadísticamente significativa con una p igual a 0.006 y 0.04 respectivamente, no así en el grupo de recuperación con una p igual a 0.68. Además, se observó una tendencia al aumento en el número de axones gruesos en el grupo de paresia y parálisis respecto al grupo control, que disminuye gradualmente hacia el grupo de recuperación, esta tendencia no logra tener significancia estadística, con una p del grupo control igual a 0.10 respecto al grupo de paresia, igual a 0.19 respecto al grupo de parálisis, e igual a 0.25 respecto al grupo de recuperación (Gráficas 2 y 3).

3.1.2.3 Conteo de las subpoblaciones de células de la glía con marcadores específicos por inmunohistoquímica

Los valores promedio del conteo total de astrocitos en el grupo control fue de 14 ± 4.24 , en el grupo de paresia fue de 21 ± 0.70 , en el grupo de parálisis fue de 48 ± 8.48 y en el grupo de recuperación fue de 31 ± 7.07 . Se observó un aumento progresivo en la población de astrocitos desde el grupo de paresia, siendo mayor en el grupo de parálisis y disminuyendo hacia el grupo de recuperación con diferencia estadísticamente significativa de grupo control con el resto a todos los grupos experimentales. Los valores de p igual a 0.02 para el grupo de paresia, ≤ 0.0001 para

el de parálisis, y 0.002 para el grupo de recuperación. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de paresia respecto al grupo de parálisis con una p igual a 0.09. En la comparación del grupo de recuperación respecto a los grupos de paresia y parálisis tampoco mostraron diferencia estadísticamente significativa con valores de p igual a 0.18 y 0.16, respectivamente (Gráfica 4).

Los valores promedio del conteo total de oligodendrocitos en el grupo control fueron de 51 ± 15.55 , en el grupo de paresia de 84 ± 16.26 , en el grupo de parálisis de 68 ± 9.19 y en el grupo de recuperación de 54 ± 7.07 . Se observó un aumento en el conteo total de oligodendrocitos del grupo de paresia respecto al grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa para una p igual a 0.01. Esta diferencia mostró una tendencia a la disminución en los grupos de parálisis y recuperación que no es estadísticamente significativa con una p igual a 0.06 y 0.73, respectivamente (Gráfica 5).

Los valores promedio del conteo total de microglia en el grupo control fueron de 16 ± 3.53 , en el grupo de paresia de 11 ± 2.82 , en el grupo de parálisis de 18 ± 0 , y en el grupo de recuperación de 13 ± 2.82 . En el grupo de paresia se observó una disminución estadísticamente significativa del conteo total de microglia respecto al grupo control, con una p igual a 0.03. Los grupos de parálisis y recuperación no mostraron diferencia significativa con una p igual a 0.27 y 0.20, respectivamente (Gráfica 6).

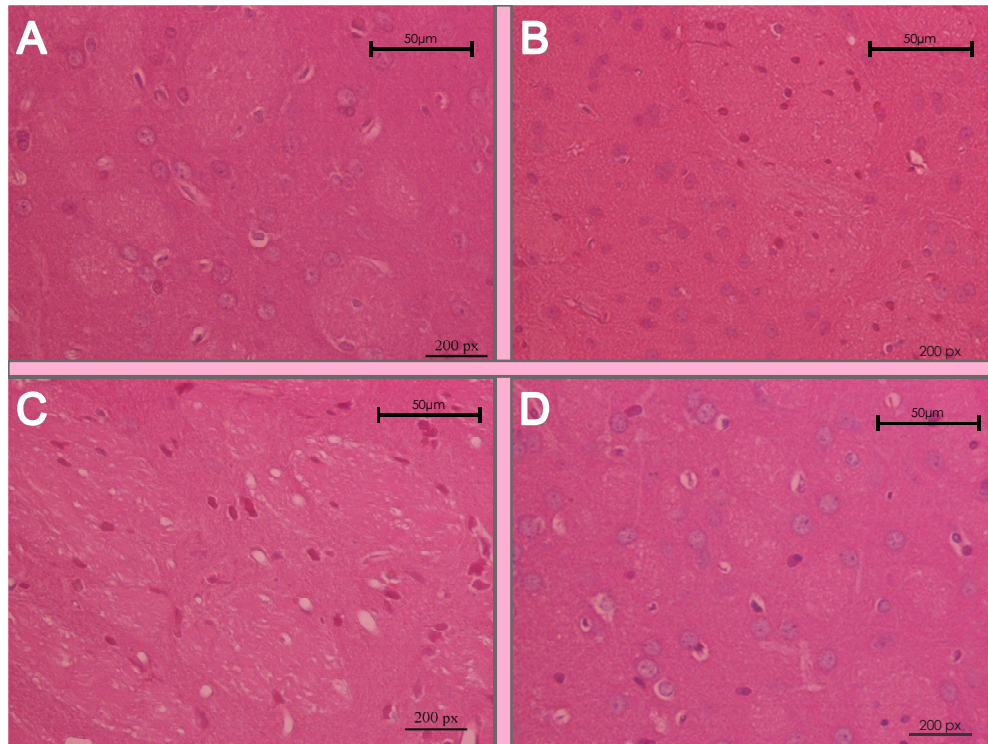


FIGURA 4. Cortes de estriado de cerebro de rata teñidos con H&E. **A:** Grupo control, **B:** Grupo de paresia, **C:** Grupo de Parálisis y **D:** Grupo de Recuperación, en todos se identifica el área de interés. Barra = 50 micras.

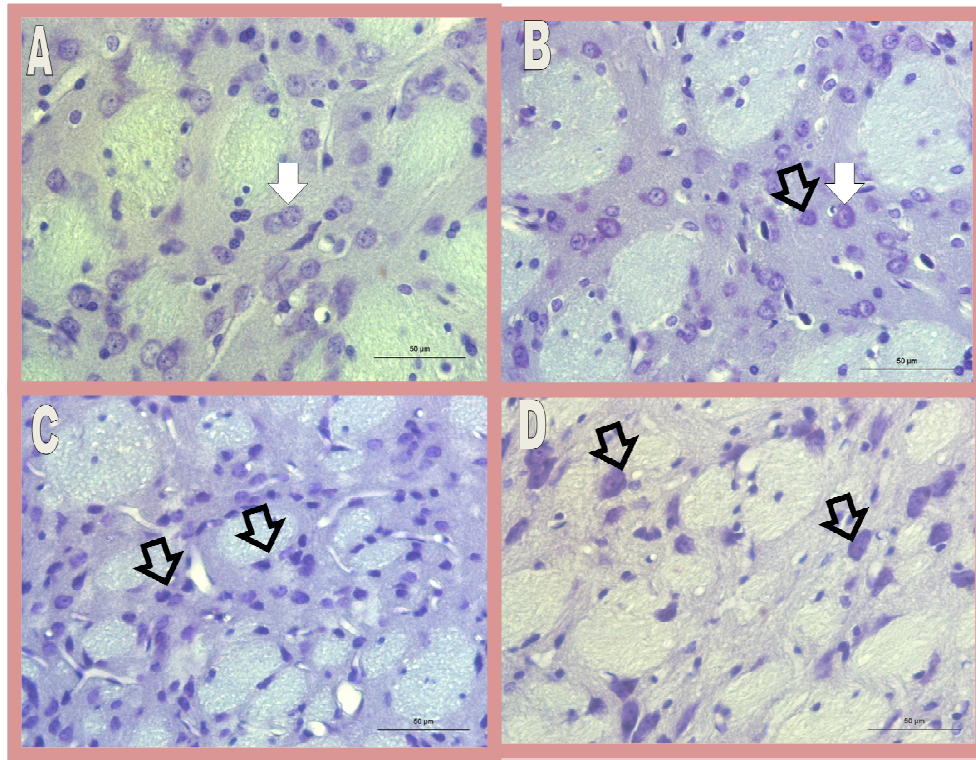


FIGURA 5. Cortes de estriado de cerebro de rata con histoquímica de Violeta de Cresilo. **A) Grupo control:** Se observan cuerpos neuronales de aspecto normal (flecha blanca). **B) Grupo de paresia:** Se observan algunas neuronas hipercrómicas y con disminución del tamaño (flecha negra), así como neuronas de aspecto normal (flecha blanca). **C) Grupo de parálisis:** Se observa un aumento de neuronas hipercrómicas y disminuidas de tamaño (flechas negras). **D) Grupo de recuperación:** Se observa que el daño en los cuerpos neuronales persiste (flechas negras). Barra =50 micras.

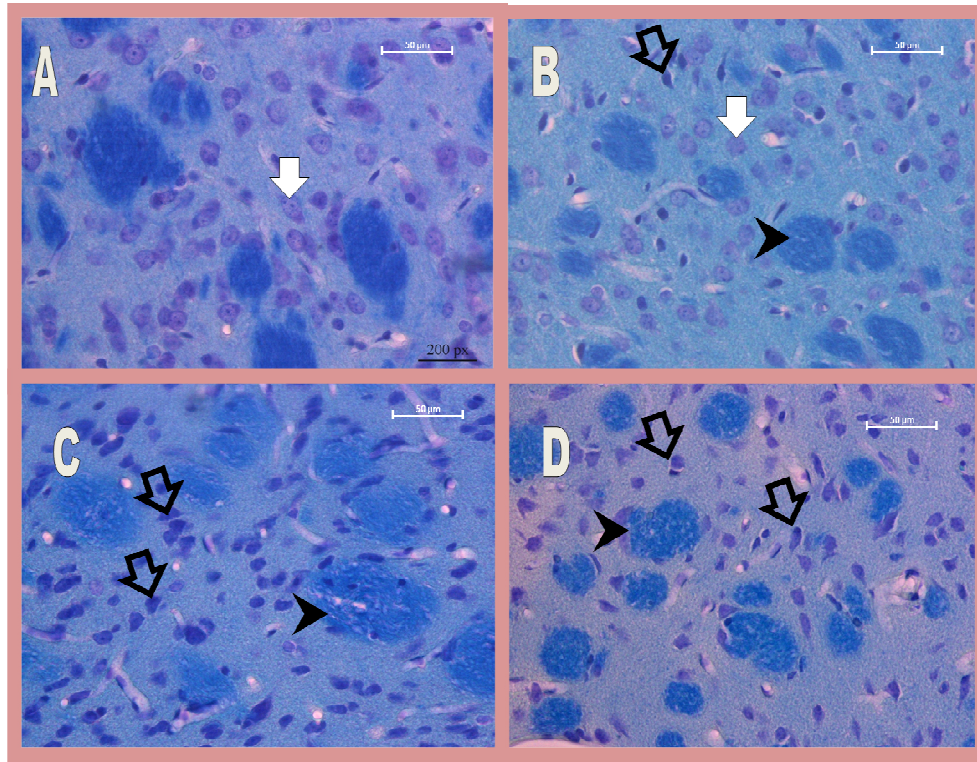


FIGURA 6. Cortes de estriado de cerebro de rata con histoquímica de Klüver-Barrera. **A) Grupo control:** Se observan cuerpos neuronales de aspecto normal (flecha blanca) y fascículos de axones con aspecto homogéneo de la mielina de color azul. **B) Grupo de paresia:** Se observan algunas neuronas hipercrómicas y con disminución del tamaño (flecha negra), así como neuronas de aspecto normal (flecha blanca) y fascículos de axones con algunas vesículas claras (cabeza de flecha). **C) Grupo de parálisis:** Se observa un aumento de neuronas hipercrómicas y disminuidas de tamaño (flechas negras) y fascículos de axones con aumento de vesículas claras (cabeza de flecha). **D) Grupo de recuperación:** Se observa que el daño en los cuerpos neuronales persiste (flechas negras) y fascículos de axones con vesículas claras (cabeza de flecha). Barra =50 micras.

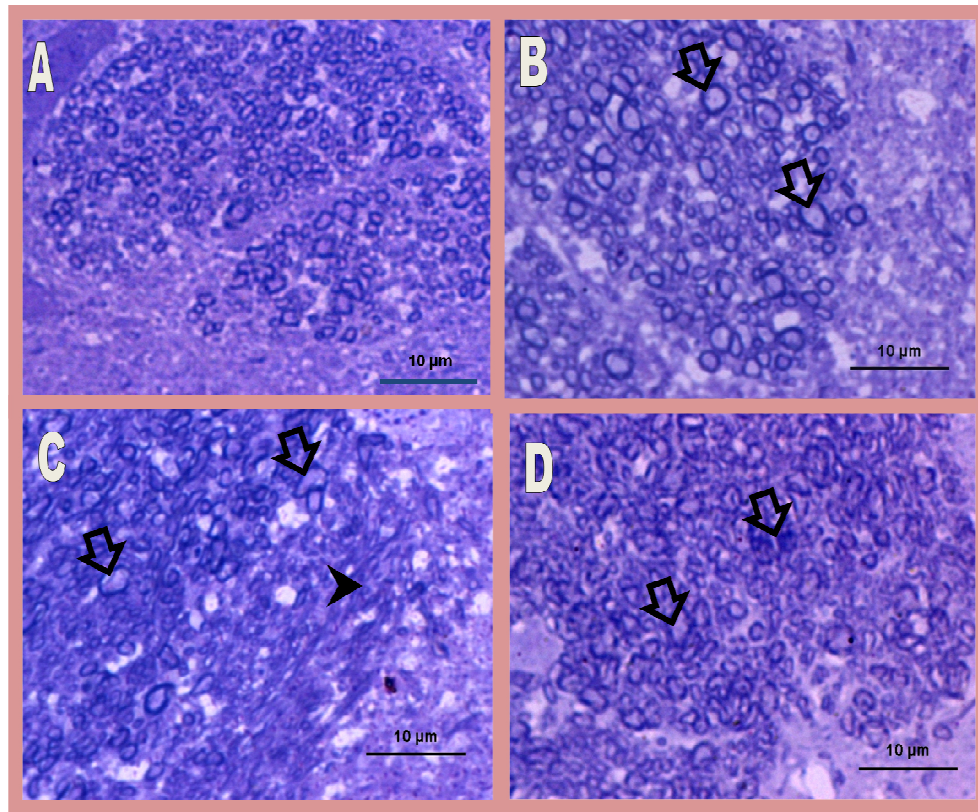
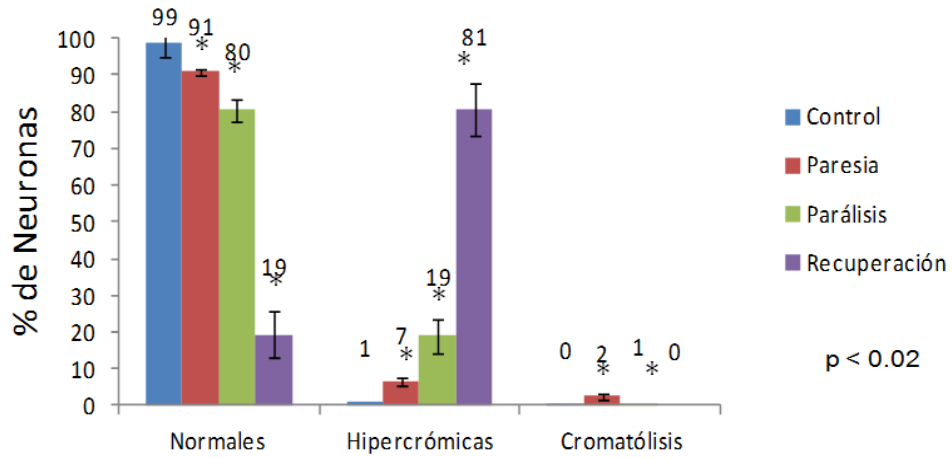
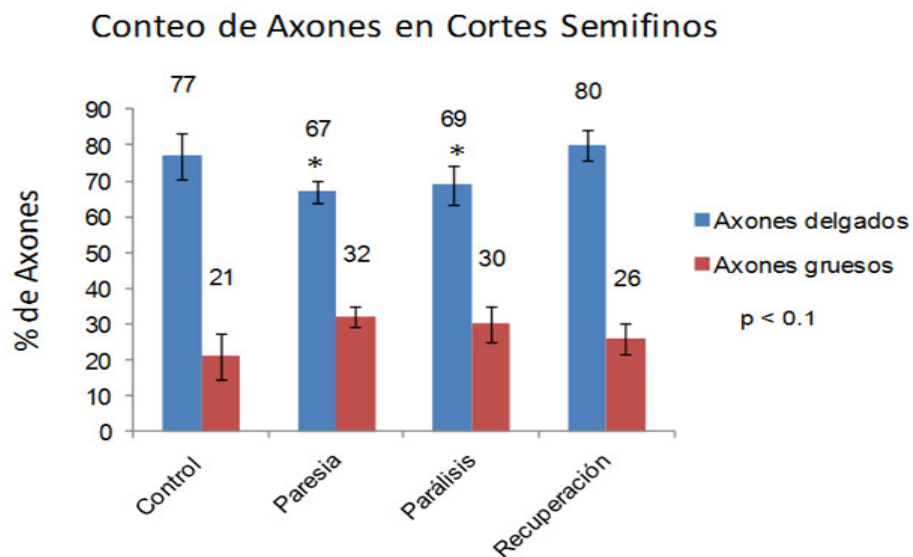


FIGURA 7. Cortes semifinos de estriado de cerebro de ratas contrastados con azul de toluidina. **A) Grupo control:** Se observan fascículos de axones de aspecto normal. **B) Grupo de paresia:** Se observan fascículos de axones de aspecto normal, con un aparente aumento del calibre (flechas negras). **C) Grupo de parálisis:** Se observan algunos axones con aumento del calibre y desorganización de la vaina de mielina (flechas negras), así como zonas de lisis axonal (cabeza de flecha). **D) Grupo de recuperación:** Se observa franca desorganización de las vainas de mielina en los axones con aparente aumento del calibre (flechas negras). Barra =50 micras.

Subpoblaciones de Neuronas

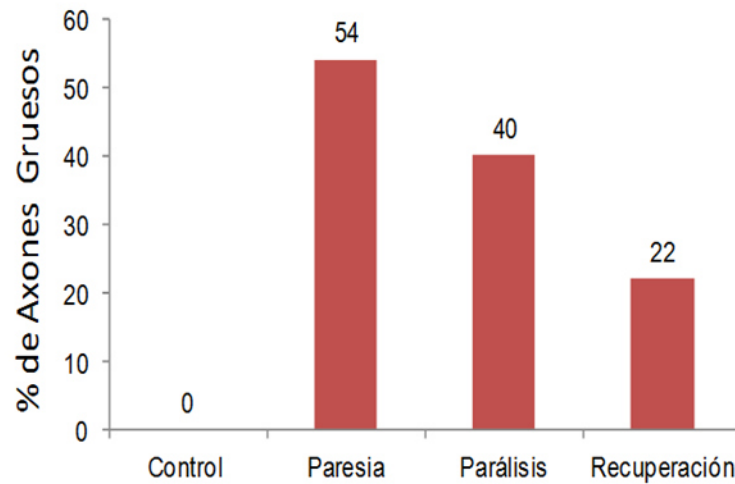


GRÁFICA 1. Conteo de las subpoblaciones de neuronas. En azul, el grupo control, en rojo el grupo de paresia, en verde el grupo de parálisis y en morado el grupo de recuperación. Se puede observar una disminución gradual del número de neuronas normales en el grupo de paresia y parálisis, siendo aún mayor en el grupo de recuperación. Se observa un aumento gradual de neuronas hipercrómicas en los grupos de paresia y parálisis, siendo aún mayor en el grupo de recuperación. El número de neuronas con cromatólisis fue bajo en todos los grupos. Todos los grupos mostraron diferencia significativa respecto al grupo control con una $p < 0.02$.



GRÁFICA 2. Conteo de axones en fascículos de cortes semifinos contrastados con azul de toluidina. En los grupos de paresia y parálisis se identificó una tendencia al aumento en el número de axones gruesos respecto al grupo control, que disminuye gradualmente hacia el grupo de recuperación. Este incremento no fue significativo. El número de axones delgados de los grupos experimentales no presentó diferencia estadística respecto al grupo control con una $p < 0.1$.

Incremento del Porcentaje de Axones Gruesos



GRÁFICA 3. Porcentaje de incremento de axones gruesos en fascículos de cortes semifinos. Se identificó un aumento en el número de axones gruesos en el grupo de paresia que disminuye gradualmente hacia el grupo de recuperación.

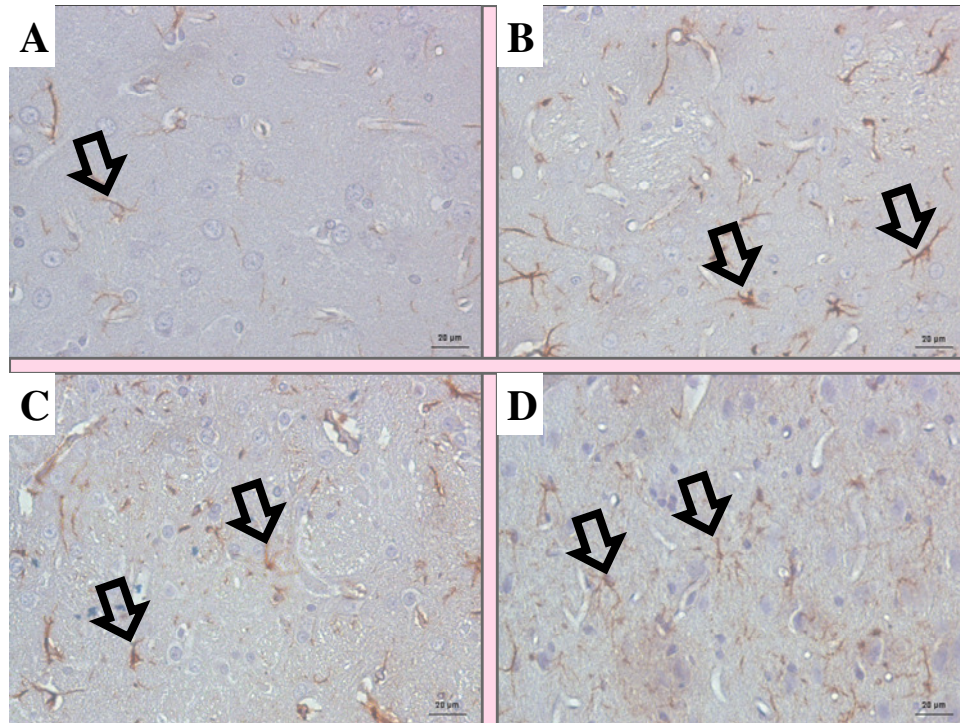
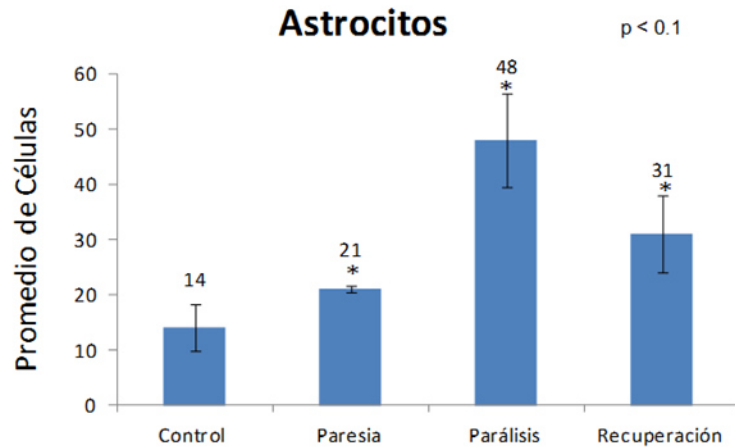


FIGURA 8. Cortes de estriado de cerebro de rata con marcaje específico para la identificación de astrocitos con proteína fibrilar glial ácida. **A) Grupo control:** Se observan astrocitos de aspecto normal, marcados con coloración parda caracterizados por proyecciones fibrilares largas (flecha negra). **B) Grupo de paresia:** Se observa un aparente aumento de los astrocitos (flechas negras). **C) Grupo de parálisis:** Se observa un mayor aumento de los astrocitos (flechas negras). **D) Grupo de recuperación:** Se observa persistencia del aumento de los astrocitos (flechas negras). Barra =20 micras.



GRÁFICA 4. Valores promedio de astrocitos por campo marcados con proteína fibrilar glial acida en grupo control y grupos experimentales. Se observa un aumento del promedio de astrocitos a partir del grupo de paresia con respecto al grupo control, siendo mayor en el grupo de parálisis y disminuyendo ligeramente en el grupo de recuperación. Todos los grupos presentan diferencia estadística significativa respecto al grupo control con una $p < 0.1$.

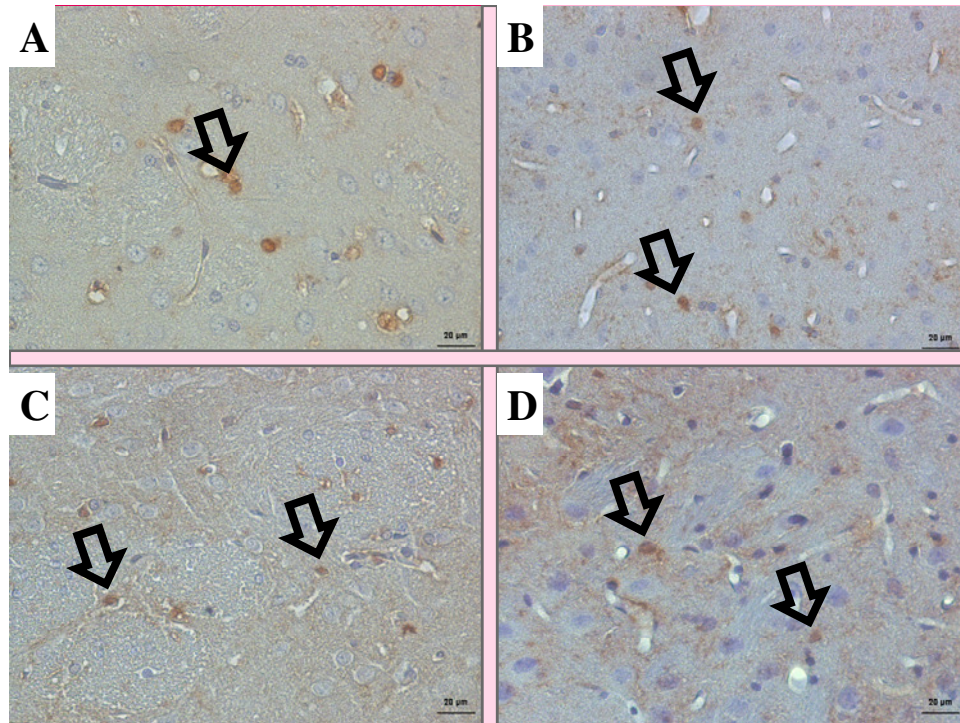
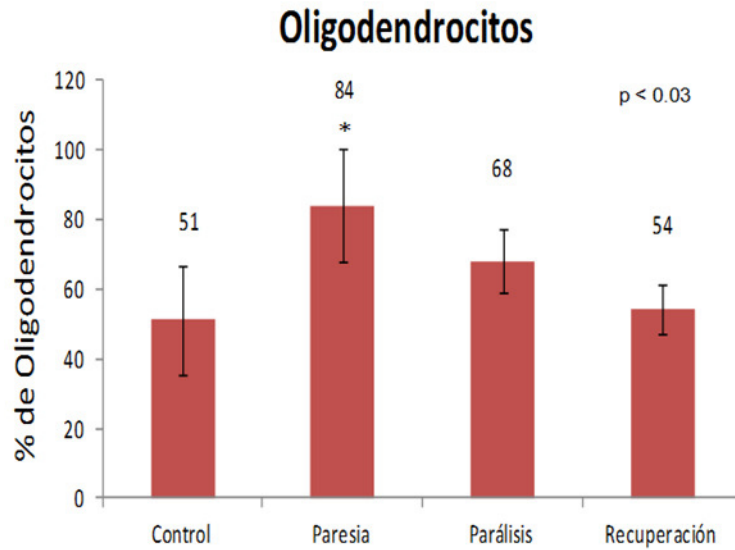


FIGURA 9. Cortes de estriado de cerebro de rata con marcaje específico para la identificación de oligodendrocitos con S100. **A) Grupo control:** Se observan oligodendrocitos de aspecto normal, marcados con coloración parda caracterizados por núcleos redondos y escasas proyecciones fibrilares (flecha negra). **B) Grupo de paresia:** Se observa un aparente aumento de los oligodendrocitos (flechas negras). **C) Grupo de parálisis y D) Grupo de recuperación:** Se observan oligodendrocitos sin un aparente aumento (flechas negras). Barra =20 micras.



GRAFICA 5. Promedio de oligodendrocitos por campo marcados con proteína S100 en grupo control y grupos experimentales. Se observa un aumento del promedio de oligodendrocitos en el grupo de paresia con respecto al grupo control, que disminuye gradualmente en los grupos de parálisis y recuperación. El grupo de paresia presenta diferencia estadística respecto al grupo control con una $p < 0.03$.

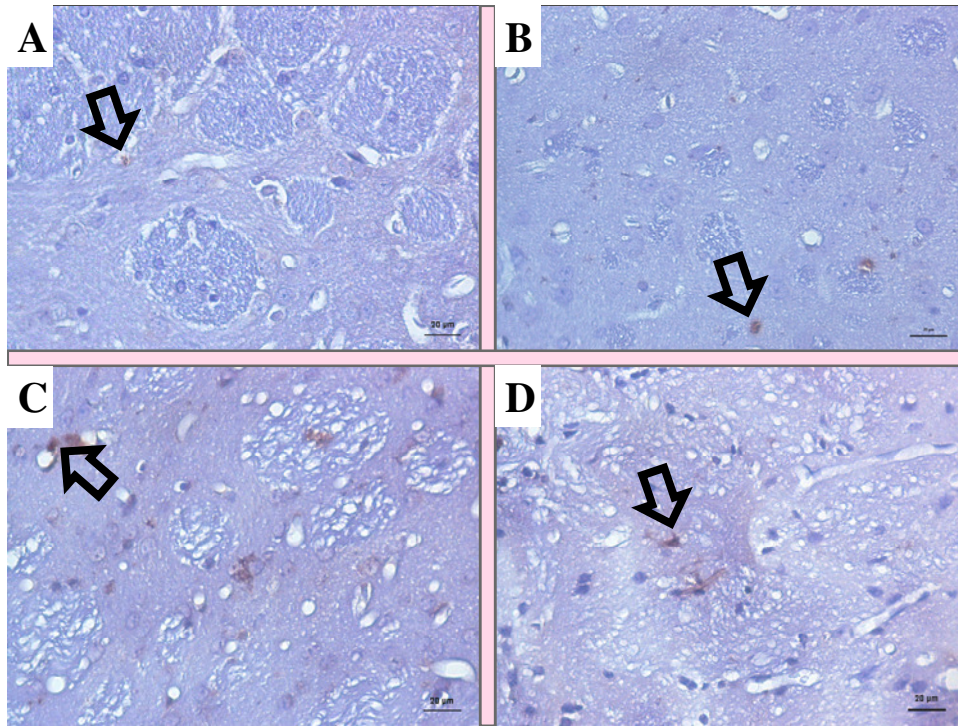
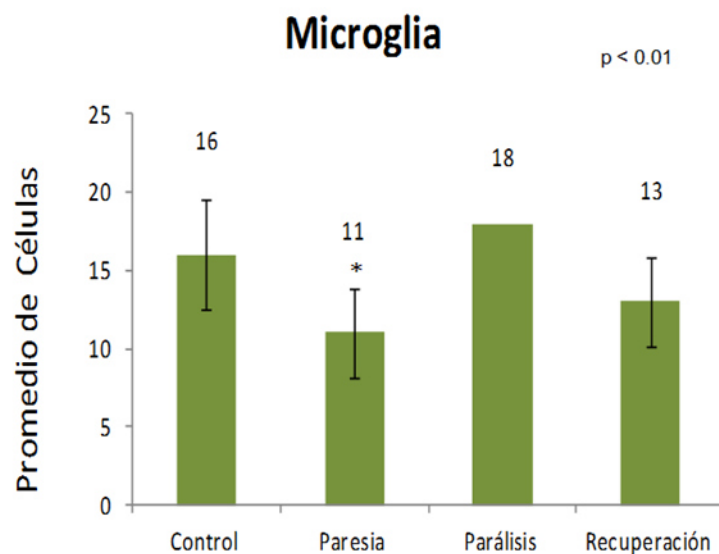


FIGURA 10. Cortes de estriado de cerebro de rata con marcaje específico con IBA-1 para la identificación de células de la microglia. **A) Grupo control:** Se observa escaso marcaje de células de la microglia caracterizadas por núcleo triangular y escasas proyecciones fibrilares (flecha negra). **B) Grupo de paresia:** Se observa una disminución en las células de la microglia (flecha negra). **C) Grupo de parálisis y D) Grupo de recuperación:** Se observan células de la microglia sin un aparente aumento respecto al grupo control (flecha negra). Barra =20 micras.



GRÁFICA 5. Promedio de células de la microglia por campo marcados con IBA-1 en grupo control y grupos experimentales. Se observó una disminución de células de la microglia en el grupo de paresia respecto al grupo control, con significancia estadística. Los grupos de parálisis y recuperación, respecto al grupo control no presentan diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Este estudio describe por primera vez alteraciones histopatológicas en el estriado causados por el fruto de *Kh* en un modelo experimental de la neuropatía periférica. Se demostró un incremento del número de neuronas hipercromáticas, vacuolas en fascículos de axones, aumento del calibre de los mismos, alternando con zonas de lisis axonal, así como desorganización del neurópilo. Las alteraciones se observaron a los 24 días posteriores a la intoxicación y se mantuvieron a los 170 días, estos signos correlacionan con lo reportado por Nuestro estudio también demuestra que la intoxicación con el fruto de *Kh* afecta a otras áreas del sistema nervioso central diferente al SNP en este modelo (Salazar *et al.*, 2006).

En las ratas intoxicadas con fruto de *Kh*, se analizaron las manifestaciones clínicas como: pérdida de peso, el pelo erizado, debilidad, dificultad respiratoria, entre otros. Estas manifestaciones estaban presentes a los 48 días en el grupo paresia, fueron más evidentes a los 58 días en el grupo de parálisis, y casi todas desaparecieron en el grupo de recuperación a los 170 días que sólo presentó piloerección. Estos resultados se correlacionan con reportes de intoxicación accidental en humanos y los reportes experimentales de animales intoxicados con fruto de *Kh*, que describen signos clínicos similares a los observados en nuestro estudio (Padrón-Puyou, 1951, Padrón y Velázquez, 1956, Bermúdez *et al.*, 1986, Salazar *et al.*, 2006, García-Juárez *et al.*, 2012). Una de las características más

notables de esta intoxicación es la debilidad en las extremidades inferiores y superiores, y parálisis (Escobar y Nieto, 1965). Es importante mencionar que elestriado se asocia con el control de los movimientos (Mc George y Faull, 1989; Buffone y Dalto, 2013), por lo que las alteraciones histopatológicas observadas en este estudio en las neuronas de esta región, pueden estar relacionadas con la debilidad, alteración en la marcha y la parálisis.

En este estudio también se observó que en los grupos intoxicados, las neuronas hipercromáticas aumentaron progresivamente en paresia, parálisis y se mantuvieron en los grupos de recuperación. La degeneración de neuronas se caracteriza a nivel microscópico de luz por contracción del cuerpo, pérdida de sustancia de Nissl, citoplasma intensamente teñido, el núcleo se observa pequeño y oscuro (picnótico) que puede eventualmente fragmentarse (Garman, 2011).

Resultados similares de neuronas hipercrómicas y cromatólisis se han descritos en estudios experimentales de animales intoxicados con *Kh* en otras áreas del SNC incluyendo médula espinal (Padrón y Velázquez, 1956, Escobar y Nieto, 1965; Charlton y Pierce, 1970; Becerra *et al.*, 2009), corteza cerebral (Padrón y Velázquez, 1956., Ortiz *et al.*, 1991; Becerra *et al.*, 2009), cerebelo (Padrón y Velázquez, 1956; Escobar y Nieto, 1965; Charlton y Pierce, 1970, Previamente fueron reportadas, en este modelo de intoxicación, alteraciones en la corteza cerebral (Becerra *et al.*, 2009), caracterizadas por un aumento de las neuronas hipercrómicas en el grupo de paresia, que disminuyó en el grupo de parálisis y de recuperación, mientras que en este estudio se observaron neuronas hipercrómicas en paresia, que aumentaron en el grupo de parálisis y permanecieron en el grupo de recuperación.

También Becerra *et al.*, (2009) describieron neuronas con cromatólisis en el grupo de paresia, con aumento en el grupo de parálisis y un incremento en el grupo de recuperación. Esto sugiere que las alteraciones en neuronas del cuerpo estriado pueden ser secundarias a las alteraciones de la corteza cerebral, debido a que en este estudio, las neuronas con cromatólisis permanecieron sin cambio. Además, está descrito que la cromatólisis aparece como una reacción a una lesión axonal (Schwab y Bartholdi, 1996)

El estriado es atravesado por múltiples haces de axones mielinizados, correspondientes a fascículos de axones aferentes y eferentes que provienen de otras áreas del sistema nervioso central como corteza cerebral (Haber y Johnson, 2004). Anteriormente se reportaron alteraciones en los axones en la corteza cerebral (Becerra *et al.*, 2009), así que esto podría estar relacionado con los espacios en la mielina y el aumento del diámetro de los axones observados en el estriado. Alteraciones similares se han descrito por algunos compuestos tóxicos en el estriado (Flint-Beal *et al.*, 1993, Spencer *et al.*, 1993; Santoyo *et al.*, 2007, Ríos *et al.*, 2009, Zarazúa *et al.*, 2010; Fuentes-Bello *et al.*, 2013).

Otra alteración histopatológica observada en el estriado fue gliosis caracterizada por una proliferación progresiva de astrocitos en los grupos intoxicados. En los animales intoxicados con *Kh* se han descrito gliosis en áreas de SNC con neuronas hipercrómicas (Escobar y Nieto, 1965; Ortiz *et al.*, 1991; Becerra *et al.*, 2009). Esta proliferación de células gliales podría estar relacionada con la disminución de las neuronas y/o la vacuolización en los fascículos de axones, ya que las toxinas de plantas podrían causar gliosis en SNC similares a las encontradas en este estudio (Pomilio *et al.*, 1989, Flint- Beal *et al.*, 1993; Carod-Artal, 2003, Soto-Blanco y Lima-Górniak, 2010, Dikibo *et al.*, 2012, Gotardo *et al.*, 2012, Bhasker *et al.*, 2014).

Las alteraciones histopatológicas encontradas en el estriado se correlacionan con las alteraciones ya descritas en otras áreas del SNC, utilizaron distintas dosis y especies de animales de experimentación intoxicados con fruto de *Kh*. Por lo que estos resultados serán útiles para dilucidar si esta intoxicación afecta también a otras áreas del SNC, que se relacionan con el estriado como sustancia negra, el tálamo y el tallo cerebral. También se requieren más estudios para dilucidar la secuencia de eventos en los áreas analizadas de SNC, y / o el mecanismo de daño involucrados.

En la actualidad, estudios relacionados con las observaciones antes mencionadas se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, para evaluar el efecto de las toxinas aisladas del fruto de *Kh* como la T-514 en estudios *in vitro* e *in vivo*.

5. Conclusiones

En este estudio, se demostró que la *Kh* induce alteraciones morfológicas en el estriado, correspondiente a hipercromía en las neuronas, desorganización de la vaina de mielina así como zonas de lisis axonal, sin datos de desmielinización.

Además de activación y proliferación de células de la glía (gliosis), principalmente por astrocitos; así como también, en el tiempo de paresia existe una disminución en las células de la microglia y un aumento en los oligodendrocitos.

Estas alteraciones persisten a pesar de la recuperación clínica de la rata. Este estudio describe por primera vez alteraciones histopatológicas en cuerpo estriado causados por la intoxicación crónica con *Kh* fruto en ratas Wistar.

6. Perspectivas

Evaluar mediante pruebas funcionales las vías involucradas en el aprendizaje y la memoria.

Evaluar la ultraestructura de neuronas y axones para caracterizar el daño reportado.

Evaluar otras zonas del SNC que están relacionadas con el estriado con posible daño como globo pálido o sustancia negra.

Evaluar a tiempos más tardíos si persisten las alteraciones morfológicas reportadas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, A. y Zolla, C. (1982). Plantas tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. D. F. 271p.
2. Arreola Nava, M. E.; Vázquez Castellanos, J. L.; González Castañeda, M. E. (2000). Factores geográficos en la epidemiología de la intoxicación por *Karwinskia* (tullidora) en México. *Cad. Saúde Pública*, Río de Janeiro. 16 (1): 255-260.
3. Bhasker AS, Sant B, Yadav P, Agrawal M, Lakshmana Rao PV. (2014). Plant toxin abrin induced oxidative stress mediated neurodegenerative changes in mice. *Neurotoxicology*. 2014 Sep; 4 4:194-203. doi: 10.1016/j.neuro. Epub 2014 Jul 7.
4. Becerra-Verdín, E. M.; Bermúdez-Barba, M.V.; Salazar-Leal, M.E.; *et al.*, (2009). *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during chronic intoxication in the rat. *Toxicon*, 53 (6): 645-51.
5. Bermúdez, M. V.; González-Spencer, D.; Guerrero, M.; Waksman, N. and Piñeyro, A. (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon*, 24 (11): 1091-1097.

6. Bermúdez, M. V.; Martinez F. J.; Salazar, M. E.; Waksman, N. and Piñeyro, A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea-pig hamster and dog. *Toxicon*, 30: 1493-1496
7. Buffone G.D. and Dalto D. (2013). Anatomía funcional del cuerpo estriado y la corteza cerebral: su relación con el movimiento. 10º Congreso Argentino y 5º Latinoamericano de Educación Física y Ciencias. La Plata, 9 al 13 de septiembre de 2013. ISSN 1853-7316 – web: <http://congresoeducacionfisica.fahce.unlp.edu.ar>.
8. Clavijero, F. X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En: Manuel León Portilla (Ed), Historia de la antigua o Baja California, Editorial Porrúa 3rd edn.; pp31-33.
9. Carod-Artal F.J. (2003). Síndromes neurológicos asociados con el consumo de plantas y hongos con componente tóxico (I). Síndromes neurotóxicos por ingesta de plantas, semillas y frutos. *Rev. Neurol.*; 36 (9): 860-871.
10. Castillo Nájera, F. (1920). Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un envenenamiento colectivo por tullidora. Memorias del Quinto Congreso Médico Mexicano.; Vol. 4p 240-244.

11. Charlton, K.M. and Pierce, K.R. (1970). A Neuropathy in Goats Caused by Experimental Coyotillo (*Karwinskia-humboldtiana*). Poisoning Part V Lesions in the Central Nervous System. *Pathol. Vet.*; 7: 435-47.
12. Dikibo, E.; Ehimigbai, J.; Eloka C.C.V.; Ekoh, S.N.; Ezeah G.A.C.; Okoro, C.J. (2012). The effect of *mondia whitei* on the histology of the brain of wistar rat. *Int. J. of Herbs and Pharmacol. Res. IJHPR*, 1(3): 62 – 67.
13. Dreyer, D.L.; Arai, I., Bachman, C.D.; Anderson, W.R.; Smith, R.G. y Daves, G. D. (1975). Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*; 97:4985-4990.
14. Domínguez, X.A.; Temblador, S.; Cedillo, M.E. (1976). Estudio químico de la raíz de la tullidora (*Karwinskia humboldtiana* Zucc.) *Rev. Latinoam. Quim.*; 7: 46-48.
15. Escobar, A. y Nieto, D. (1965). Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Med. Mex.*; 95:163-177.
16. Einarson, L. (1932). A method for progressive selective staining of Nissl and nucleus substance in nerve cells. *Am. J. Pathol.*; 8(3), 295-308

17. Fernández-Nava R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot* ; 63(1): 1-23.
18. Flint Beal, M.; Brouillet, E.; Jenkins, B.G.; Ferrante, R.J.; Kowall, N.W.; Miller, J.M.; Storey, E.; Srivastava, R.; Rosen, B.F. and Hyman, B.T. (1993). Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *J. of Neurosc.* 13(10): 4181-4192.
19. Fuentes-Bello, A.C; Pérez-Carrera, D.; Pérez-de la Cruz, V.; Santamaría-del Ángel, A.; Carrillo-Mora, P. (2013). Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata. *Investigación en discapacidad*. Vol. 2, Núm. 1, pp 3-11.
20. García, G. R. (2013). Evaluación Morfológica de Hígado, Riñón y Pulmón en un Modelo de Intoxicación Crónica con el Fruto Maduro de *Karwinskia humboldtiana* en la Rata Wistar. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. UANL.<http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesis.uanl.mx:1080240827>

21. García, G. R.; Salazar, L. M. E.; Becerra, V. E. M.; Romero, D. V.; García, J. J.; Soto, D. A. & Sepúlveda, S. J. (2013). Células cebadas en pulmón y nervio periférico en la intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* en rata Wistar: estudio histológico e histoquímico. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1216-1222.
22. García, G. R.; Salazar, L. M. E.; Romero, D. V.; García, J. J.; Soto, D. A. Juárez, R. O. A. & Sepúlveda, S. J. (2013). Intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar: daño renal. *Inti. J. Torpor.*, 31(4):1449-1454.
23. García-Juárez, J.; Salazar-Leal, M.E.; Guzmán-López, S.; Romero-Díaz, V.J.; Ramírez-Durón, R.; & Sepúlveda-Saavedra, J. (2012). Evaluación del Efecto del Tratamiento con Acido Lipoico Administrado a la Rata Wistar Intoxicada con el Fruto de *Karwinskia humboldtiana*. *Int. J. Morphol*, 30(2), 572-578.
24. Garman, R.H. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol*; 39:22–35.
25. Gotardo, A.T.; Schumacher, B.H.; Pfister, J.A.; Traldi, A.S.; Maiorka, P.C.; Spinosa, H.S.; Górnica, S.L. (2012). The use of ultrasonography to study teratogenicity in ruminants: evaluation of *Ipomoea carnea* in goats. *Birth*

Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Aug; 95(4):289-95. doi: 10.1002/bdrb.21017. Epub 2012 May 29.

26. Haber, S. N. and Johnson, M. (2004). The basal ganglia. The Human Nervous System, Second ed. chapter 21: 676-737.

27. Ito, S. and Karnowsky, M. (1968). Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds, *J. Cell. Biol.*, 39:168a-9^a.

28. Izquierdo, A. E. and Nieto, D. (1965). Aspectos neurohistopatológicos de la intoxicación con *Kh*. Estudio experimental. *Gac. Med. Mex.*; 95:163-177

29. Knight, A.P. and Watter, R.G. (2001). A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America .*Teton New Media Jackson*.

30. Klüver, H. and Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers of nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 12(4), 400-403.

31. Mc George, A.J. and Faull, R.L. (1989).The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, vol. 29, No 3 pp 503-537.

32. Muñoz, M.E.; Chavez, B. (1979). Conduction block and functional denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Exp. Neurol.* 65, 255-270.

33. Muñoz, M.E.; Chavez, B.; Nthan, J. (1983). Denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Neuropathol. Appl.* 9 (2), 121-134.
34. Ortiz, G.G.; González, B.J.; Feria, V.A. (1991). Structural study of the acute effect of *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus and caudate nucleus of the rat. *Gen. Pharmacol.*; 23 (3), 543-547.
35. Padrón, F. (1951). Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. *Gac. Med. Mex*, 81: 300-311.
36. Padrón, F.; Velázquez, T. (1956). Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Mex. Ped.*; 25, 225-237.
37. Paxinos, G.; Watson, C. (2005). *The Brain in Stereotaxic Coordinates*, fifth ed. Elsevier Academic Press, San Diego California.
38. Pomilio, A.B.; Rofi, R.D.; Gambino, M.P; Mazzini, C.A.; Debenedetti de Langenheim, R.T. (1989). The lethal principle of *Poa huecu* (Coiron Blanco): a plant indigenous to Argentina. *Toxicon* Vol 27, Issue 12, pag. 1251–1262.
39. Ríos, R.; Santoyo, M.E.; Sepúlveda-Saavedra, J.; Romero-Díaz, V.; Jiménez, V.; Delgado, J. M.; Jiménez-Capdeville, M.E. (2009).

40. Morphological changes in the striatum of arsenic exposed rats. *Journal of Neurochemistry*, Vol: 110.
41. Rivas, V.; Torres, R.; Waksman, N. (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *J. Med. Plant. Res.* 56(6), 562-564.
42. Salazar, L. M.; Flores, M. S.; Sepúlveda, S. J.; *et al.* (2006). An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. *J. Peripher. Nerv. Syst.*; 11(3), 253-261.
43. Santoyo, M. E.; Sepúlveda-Saavedra, J.; Zarazúa S.; Pérez-Severiano, F. Romero-Díaz, V.J.; Ceballos F.; Juárez B.I. and Jiménez- Capdeville, M.E. (2007). Neurochemical and morphological alterations in the rat brain associated with chronic arsenic exposure. In “New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies”, Santamaría A. and Jiménez-Capdeville M.E. (eds) Research Signpost. ISBN: 81-308-0164-7.
44. Schwab, M.E.; Bartholdi, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* 76 (2), 319–370.
45. Spencer P.S.; Ludolph A.C. and Kisby G.E. (1993). Neurological diseases associated with use of plant components with toxic potential. *Environ. Res.* 62 106-113.

46. Soto-Blanco, B. and Lima-Górniak S. (2010). Toxic effects of prolonged administration of leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to goats. *Experim and Toxicol Pathol*. Vol 62, Issue 4, Pages 361–366.
47. Waksman, N.; Martínez, L.; Fernández, R. (1989). Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia*. *Rev.Latinoamer. Quim.*; 20 (1): 27-29.
48. Waksman, N.; Ramirez, N. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamericana. Quim.* 23(1), 25-27. 521
49. Zarazúa, S.; Ríos, R.; Delgado, J.M.; Santoyo, M.E.; Ortiz-Pérez, D.; Jiménez-Capdeville, M.E. (2010). Decreased arginine methylation and myelin alterations in arsenic exposed rats. *NeuroToxicology*. Vol. 31. pp 94-100.

APENDICES

APENDICE A

Preparación de Reactivos

Fijador Karnovsky-Ito.

Se disuelven 16 g de paraformaldehído en 400 ml de agua de-ionizada.

Calentar cerca del punto de ebullición y agregar gotas de hidróxido de sodio 1N para quitar la turbidez.

Agregar 32 ml de glutaraldehído al 25%.

Agregar 0.08 g de ácido pícrico.

Agregar 400 ml de buffer de cacodilatos 0.1M (pH 7.2 - 7.4).

Guardar en frasco ámbar.

Buffer de Cacodilatos 0.1M (pH 7.2-7.4)

Solución A.

100 ml de agua destilada.

Añadir 4.28 g de cacodilato de sodio.

Solución B.

25 ml de agua destilada.

Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico.

Solución de trabajo.

A 100 ml de solución A

Se le añaden 5.4 ml de la solución B

Se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4

Se afora a 200 ml con agua destilada.

Tetraóxido de osmio 2% en buffer de cacodilatos.

50 ml de buffer de cacodilatos 0.1M (pH 7.2 - 7.4).

Añadir 1g de tetraóxido de osmio.

La capsula de tetraóxido de osmio se cubre con una gasa para asegurarnos de no tocarla con los dedos. Se lava con extrán y agua de la llave. Se enjuaga con agua destilada y luego con ultrapura.

Se lava un frasco ámbar con las mismas especificaciones que para la capsula de tetraóxido de osmio. Se introduce la capsula al frasco, se tapa y se agita hasta que se quiebre la capsula. Se agrega buffer de cacodilatos bajo una campana de extracción y se deja reposar bien tapado toda la noche a temperatura ambiente para que se disuelva.

Paraformaldehído 4%

40 g de Paraformaldehído

160 ml de PBS 1x

Calentar a 60° C hasta que el líquido pierda la turbidez si es necesario se agregan unas gotas de Hidróxido de Sodio 1N.

Nitrato de Uranilo.

1 g nitrato de uranilo

Aforar con 100 ml de agua destilada.

Resinas Epóxicas

| | |
|--------|------------------|
| Resina | 23.8 ml (29 g) |
| DDSA | 16 ml (16 g) |
| NMA | 11.5 ml (14.3 g) |
| DMO30 | 1 ml (1 g) |

En el estudio se utilizó resina epóxica MEDIA

Solución de Azul de Toluidina al 1%

| | |
|-------------------------|-------|
| Borato de sodio (Borax) | 5g |
| Agua destilada | 100ml |
| Calentar hasta disolver | |
| Azul de toluidina | 1g |
| Se filtra. | |

Solución de formalina 4 %

* Para preparar 500 ml

| | |
|------------------|--------|
| Paraformaldehído | 20 g |
| Agua destilada | 450 ml |

* Calentar a 60 °C por 30 minutos

PBS 10 X

* Para preparar 100 ml

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8.0 g |
| KCl | 0.20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 g |

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

PBS 1X

* Para preparar 500 ml

| | |
|----------------|--------|
| PBS 10X | 50 ml |
| Agua destilada | 450 ml |

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

Glutaraldehído 2.5 %

| | |
|---|-------|
| Glutaraldehído 25 % | 10 ml |
| Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4 | 90 ml |

Laminillas con Poly-L-lisina

45 ml de agua destilada

5 ml de Poly-L-Lisina

En un Koplein de plástico (ya que el polímero se pega en superficie de vidrio) se introducen las laminillas por un tiempo de 5 min asegurándose que se cubra la totalidad de la laminilla.

APENDICE B

PROCESAMIENTO PARA INCLUSION DE BLOQUES EN PARAFINA:

1. Paraformaldehído 4% por 48 horas

2. Deshidratación :

Acetona 60% por 30 minutos.

Acetona 70% por 30 minutos.

Acetona 80% por 30 minutos

Acetona 90% por 30 minutos

Acetona 100% por 30 minutos (2 cambios)

Acetona al 100% y Xilol (1:1) por 60 min

3. Aclaramiento

Xilol (1) por 60 min

Xilol (2) por 60 min

4. Inclusión

Parafina liquida 1° baño 60 min

Parafina liquida 2° baño 60 min

5. Microtoma

6. Montaje inicial

Consideraciones especiales:

Parafina es fundida a una temperatura entre los 56 a 58°C

Después del segundo baño de parafina, para la elaboración de los bloques se toman los casetes con los órganos, se colocan en el molde, se orienta la pieza para obtener cortes en sentido coronal y se vierte la parafina fundida.

Los cortes se realizan con el micrótomó del espesor deseado, se obtiene una tira de cortes y se usa el baño de flotación (unidad térmica con agua a 40°C de temperatura) para extender los cortes a base de calor y evitar los pliegues, se agrega alcohol al 10% sobre el portaobjetos para obtener una extensión más rápida y adecuada. Finalmente ya extendidos los cortes se montan en el portaobjetos y se dejan secar durante toda la noche.

Preparación de reactivos Apéndice A.

APENDICE C

TINCIÓN DE RUTINA CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Hematoxilina de Gill:

| | |
|------------------------------|--------|
| Agua destilada | 730 ml |
| Etilenglicol | 250 ml |
| Hematoxilina anhidra (polvo) | 2.0 g |
| Yodato de sodio | 0.2 g |
| Sulfato de aluminio | 17.6 g |
| Ácido acético glacial | 2.0 ml |

*Filtrar antes de usar por primera vez.

Eosina (Solución stock concentrada):

| | |
|--------------------|-------|
| Eosina amarillenta | 1.0 g |
| Agua destilada | 20 ml |
| Etanol al 96% | 80 ml |

Solución de trabajo:

| | |
|-----------------------|---------|
| Solución stock. | 25 ml |
| Etanol al 80% | 74.5 ml |
| Ácido acético glacial | 0.5 ml |

Alcohol ácido:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Etanol al 70%. | 99 ml |
| Ácido clorhídrico concentrado | 1.0 ml |

Agua amoniacal:

| | |
|---------------------|--------|
| Hidróxido de amonio | 99 ml |
| Agua destilada | 1.0 ml |

PROCEDIMIENTO:**1. Desparaafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:**

Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.

Xilol por 5 minutos.

Etanol-xilol por 2 minutos.

Etanol absoluto por 2 minutos.

Alcohol 96% por 2 minutos.

Agua destilada por 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).

2. Tinción con hematoxilina

*Limpiar la superficie de la hematoxilina con un papel filtra antes de usar

Hematoxilina por 2 minutos.

Agua corriente 2 inmersiones lentas.

Alcohol ácido 1 inmersión rápida.

Agua corriente 2 inmersiones rápidas.

Agua amoniacal 1 inmersión rápida.

Agua corriente 2 inmersiones.

*Eliminar el exceso de agua de las laminillas antes de sumergirlas en eosina.

3. Tinción con eosina:

Eosina (solución trabajo) por 1 minuto.

Etanol 96% 1 inmersión rápida.

Etanol 96% por 2 minutos.

Etanol absoluto por 2 minutos (2 cambios).

Etanol-xilol (1:1) por 2 minutos.

Xilol por 2 minutos (2 cambios).

4. Montar los cortes teñidos con entellan.

APENDICE D

HISTOQUIMICA VIOLETA DE CRESILO.

Cortes de parafina de 10 micras.

Reactivo de tinción:

| | |
|--------------------|--------|
| Violeta de cresilo | 0.5 g |
| Agua destilada | 100 ml |

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafrinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:

Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.

Xilol por 5 minutos.

Etanol-xilol por 2 minutos.

Etanol absoluto por 2 minutos.

Alcohol 96% por 2 minutos.

3. Violeta de cresilo por 30 min.

4. Deshidratación

Alcohol 96% 2 inmersiones.

Alcohol Absoluto 2 inmersiones.

Xilol 2 minutos (2 cambios).

6. Montar los cortes teñidos con entellan.

APENDICE E

HISTOQUIMICA KLÜVER-BARRERA

Cortes de parafina de 10 micras

Azul Luxol rápido (Solución A):

| | |
|----------------------|---------|
| Azul luxol | 1.0 g |
| Metanol absoluto | 1000 ml |
| Ácido acético al 10% | 5 ml |
| Mezcla y filtra. | |

Reactivo diferenciador 1 (solución B):

| | |
|--------------------|--------|
| Carbonato de litio | 0.05 g |
| Agua destilada | 100 ml |

Reactivo diferenciador 2 (solución C):

Alcohol absoluto al 95%.

Reactivo de tinción (solución D):

| | |
|--------------------|--------|
| Violeta de Cresilo | 0.5 g |
| Agua destilada | 100 ml |

Reactivo diferenciador 3 (solución E):

| | |
|-----------------------|--------|
| Alcohol | 100 ml |
| Ácido acético glacial | 250 ml |

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:

Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.

Xilol por 5 minutos.

Etanol-xilol por 2 minutos.

Etanol absoluto por 2 minutos.

Alcohol 96% por 2 minutos.

Agua destilada por 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).

2. Sumergir en ***solución A*** por 2 horas a 60°C, o 37°C toda la noche.
3. Enjuagar en alcohol al 70%.
4. Enjuagar en agua corriente.
5. Diferenciar en ***solución B*** hasta distinguir la sustancia blanca y gris claramente y sumergir rápidamente en ***solución C***.
6. Enjuagar en agua corriente.
7. Verificar la diferenciación al microscopio y repetir paso 5 si es necesario
8. Sumergir en ***solución D*** de 10-20 minutos.
9. Enjuagar en agua corriente.
10. Sumergir en ***solución E*** de 4-8 segundos.
11. Deshidratación:
Etanol 96% 1 inmersión rápida.
Etanol 96% por 2 minutos.
Etanol absoluto por 2 minutos (2 cambios).
Etanol-xilol por 3 minutos.
Xilol por 2 minutos (2 cambios).
12. Montar los cortes teñidos con entellan.

APENDICE F

MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO CON SISTEMA ENVISION

1. **Desparafinar a 60°C**, cuidar no se aumente la temperatura demasiado para no tener problemas con la identificación de los antígenos e **hidratar los cortes** en las siguientes soluciones:

Xilol por 5 minutos (2 cambios).

Etanol absoluto por 3 minutos.

Etanol 95 % por 3 minutos.

Etanol 70 % por 3 minutos.

Agua destilada por 3 minutos.

Solución Tris-buffer salino buffer salino+Tween 20 (TBST) por 3 minutos.

2. **Recuperar los antígenos con solución TRS** (Target Recovery Solution) se introducen las laminillas en koplín de plástico que se quedan abiertos en una olla de vapor (a baño María) 60 minutos a 100 °C.

3. **Bloquear la peroxidasa endógena** con H_2O_2 3 % 10 minutos.

4. **Lavar** en solución buffer TBST 3-5 minutos (2 veces).

5. **Bloquear las proteínas endógenas** con suero de caballo al 3% por 30 minutos.

6.- **Lavar** en TBST 3-5 minutos (2 veces).

7.- Añadir el **anticuerpo primario** 45 min o toda la noche a 4 °C.,

* Para los controles negativos se omite el anticuerpo primario y se añade en su lugar TBST.

8.- **Lavar** en TBST 3-5 min (2 veces).

9.- Añadir el **anticuerpo secundario** (Sistema Envision, consiste en un polímero que lleva varias de anticuerpo secundario y moléculas de peroxidasa) por 30 minutos, se puede poner un trozo de microfilm para que la gota permanezca sobre la muestra,.

10.- **Lavar** en TBST 3-5 minutos (2 veces).

11.- **Revelar** con solución de sustrato-cromógeno con 19 gotas de H_2O_2 + 1 gota de revelador DAB (3'3-diaminobencidina) al 5% por 7-10 minutos.

CONTRATINCIÓN:

1. **Lavar** en agua destilada por 2 minutos (3 veces).

2. **Contrastar** con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 minutos.

3. **Lavar** en agua corriente.

4. Enjuagar en agua destilada.

5. **Deshidratar** gradualmente con:

Etanol 70 % por 3 minutos (2 cambios).

Etanol 95 % por 3 minutos (2 cambios).

Etanol 100 % por 3 minutos (2 cambios).

Xilol por 3 minutos (2 cambios).

6. **Montar** con entellan

Consideraciones especiales

Es importante hacer una correcta identificación de las laminillas previo al procesamiento, tener una gasa para retirar el exceso de solución en la laminilla y utilizar en cada paso requerido una pipeta totalmente limpia a fin de evitar contaminación.

APENDICE G

PROCESAMIENTO INCLUSION EN RESINAS EPÓXICA

1. Fijar el tejido en una solución de Karnovsky-Ito a temperatura ambiente por 1 hora.
2. Lavar en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH 7.2 - 7.4) 3 veces con duración de 5 minutos cada uno.
3. Post-fijar con tetraóxido de osmio al 2% por 30 minutos.
4. Lavar en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH 7.2 - 7.4) 3 veces con duración de 5 minutos cada uno
5. Contrastar con nitrato de uranilo al 1% por 30 minutos
6. Lavar en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH 7.2 - 7.4) 3 veces con duración de 5 minutos cada uno
7. Deshidratar

Acetona 30% por 10 minutos.

Acetona 50% por 10 minutos.

Acetona 70% por 10 minutos

Acetona 90% por 10 minutos

Acetona 100% por 10 minutos (3 cambios).

8. Impregnación del tejido en una mezcla de 1:1 de Acetona-Epón durante toda la noche, para dejar evaporar bajo campana.
9. Retirar los residuos de la mezcla 1:1 de Acetona-Epón y aplicar Epón puro por 1 hora.
10. Polimerización a 60°C durante 12 a 72 hrs.

La información sobre la preparación de los reactivos se detalla en el Apéndice A.

APENDICE H

TINCION DE CORTES SEMIFINOS CON AZUL DE TOLUIDINA

1. Obtener cortes semifinos de 350 nm del tejido procesado con resinas epóxicas.
2. Colocar los cortes sobre un portaobjetos.
3. Mediante el uso de una placa de calor pegar los cortes al portaobjetos.
4. Colocar una gota de azul de toluidina (5 g de borato de sodio, 100 mL de agua desionizada y 1g de azul de toluidina) sobre los cortes por 10 segundos.
5. Lavar el portaobjetos con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.
6. Pasar gentilmente una gasa limpia sobre los cortes para secar el exceso de agua.

La información sobre la preparación de los reactivos se detalla en el Apéndice A.

8.- Producción Científica

XXV CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA

1^{er} REUNIÓN NACIONAL DE NEUROMORFOLOGÍA

7° CONCURSO NACIONAL ESTUDIANTIL DE MORFOLOGÍA

XXII ENCUESTRO NACIONAL

**XIII IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN
ODONTOLOGÍA**

XXXVII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA

1^{er} CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA

ARTÍCULO DE REVISIÓN:

Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*:

**LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y
PERIFÉRICO.**

**HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN STRIATUM
CAUSED BY *Karwinskia Humboldtiana* (Buckthorn) FRUIT IN AN
EXPERIMENTAL MODEL OF PERIPHERAL NEUROPATHY**



XXV



CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA
"Mtra. Concepción Rugerío y Vargas"
1ER. ENCUENTRO NACIONAL DE NEUROMORFOLOGÍA

Se otorga la presente:

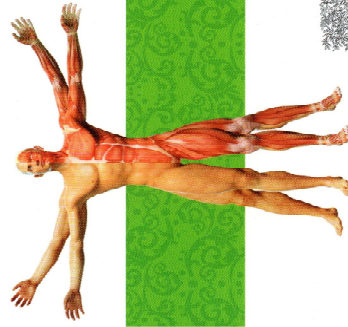
CONSTANCIA

a Díaz Pérez R, Carcaño Díaz K, García Juárez J, Montes de Oca Luna R, Saucedo Cárdenas O, Soto Domínguez A

por haber presentado el trabajo titulado

Evaluación morfológica de estriado en la intoxicación crónica con Karwinskia humboldtiana en rata Wistar

en el 1er ENCUENTRO NACIONAL DE NEUROMORFOLOGÍA
XXV CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA y
realizados del 1 al 4 de octubre de 2014 en Durango, Dgo.



Dra. Ma. Isabel García Peláez
Presidenta Ejecutiva
Sociedad Mexicana de Anatomía

Dr. Carlos Castillo Rangel
Presidente
Encuentro Nacional de Neuromorfología



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Subdirección de Educación Continua

2429

Otorga la presente:

Constancia

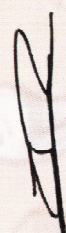
A:

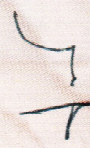
**Rosa Nelly Díaz Pérez, Kathya Carcaño Díaz, Jaime García Juárez,
Roberto Montes de Oca Luna, Odila Saucedo Cárdenas, Adolfo Soto Domínguez**



Por la presentación del trabajo: EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESTRIADO EN LA
INTOXICACIÓN CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR

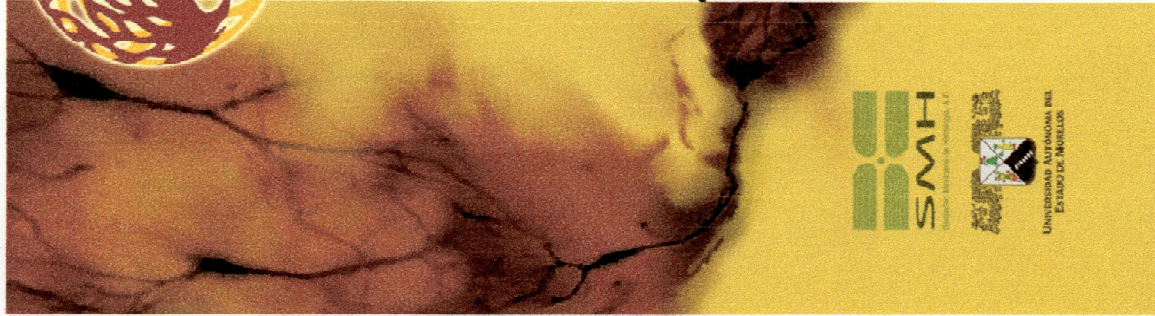
En el XXII Encuentro Nacional y XIII Congreso Iberoamericano
de Investigación en Odontología efectuado los días 27, 28 y 29 de noviembre
del presente, en nuestra Institución.


DRA. ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA DE LA UANL


DR. JORGE ALANÍS TAVIRA
SOCIEDAD NACIONAL DE INVESTIGADORES
EN ODONTOLOGÍA



Monterrey, N.L., noviembre de 2014



**XXXVII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA Y
1er CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA
"Sinapsis del Conocimiento"**

LA SOCIEDAD MEXICANA DE HISTOLOGÍA A. C.,
EL COMITÉ IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA Y
EL CUERPO ACADÉMICO "MANEJO BIOTECNOLÓGICO DE RECURSOS
ACUÁTICOS" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS
UAEN



OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA A:

**Díaz Pérez Rosa N., Carcaño Díaz K., García
Juárez J., Montes de Oca Luna R., Saucedo
Cárdenas O. y Soto Domínguez A.**

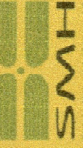
Por su presentación en Cartel en la temática de Histopatología
Experimental con el trabajo Intitulado:



MORELOS
PODER EJECUTIVO

Cuernavaca, Morelos del 29 al 31 de Octubre del 2014

**"EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESTRIBADO EN LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON Karwinskia humboldtiana EN RATA WISTAR"**



Universidad Autónoma del
Estado de Morelos

Dr. Juan Francisco Madrid Cuevas
Presidente
Comité Iberoamericano
de Histología

Dra. Claudia Sierra Castillo
Presidenta
Sociedad Mexicana de
Histología A. C.



Secretaría
de Innovación,
Ciencia y Tecnología
MORELOS

Consejo de
Ciencia y Tecnología
MORELOS
del Estado de Morelos

Profs. F. Hernández and J.F. Madrid, Editors
School of Medicine
University of Murcia
30100 Espinardo - MURCIA
SPAIN Fax: 34-868887508 / 34-868884150

Histology and
Histopathology

http://www.intervet.es
e-mail: fhcalvo@um.es / jfmadrid@um.es

Our reference: B-5699

September 3, 2015

Dr. C. Adolfo Soto-Domínguez
Facultad de Medicina de la UANL
Departamento de Histología
Monterrey NL 64460
MEXICO
e-mail: ibqasoto@yahoo.com.mx

Dear Dr., Soto-Domínguez,

We are pleased to inform you that the paper entitled "HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE STRIATUM CAUSED BY *KARIWINSKIA HUMBERTIANA* (BUCKTHORN) FRUIT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PERIPHERAL NEUROPATHY" is acceptable for publication in HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, but it is necessary that you prepare the paper according to the editor's comments.

Note that publication of your paper will proceed on receipt the payment of 1050 euros, to cover part of the printing cost. The color printed pictures are very expensive. You will receive the invoice after you return your manuscript corrected according to the attached comments. The printer will begin to work with your article after reception of the payment; then, is when your article will be formally accepted. If the institution that will pay the invoice is member of the EU, we need to know their VAT number for intra-community operation. It should be allowed to make intra-community operations. If not, the invoice should be increased with the VAT tax.

Yours sincerely,



Prof. Francisco Hernández-Calvo, Founder and Editor
HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY
e-mail: <fhcalvo@um.es>

Histopathological alterations in the striatum caused by *Karwinskia humboldtiana* (Buckthorn) fruit in an experimental model of peripheral neuropathy.

Díaz-Pérez RN¹, Castillo-González JA¹, Carcaño-Díaz K¹, García-Juárez J¹, Salazar-Leal ME², Muñoz-Maldonado GE³, Montes-de-Oca-Luna R¹, Saucedo-Cárdenas O⁴, Soto Domínguez A⁵.

Abstract

The accidental ingestion of *Karwinskia humboldtiana* (Kh) fruit in humans and animals causes chronic or acute intoxication. Acute poisoning induces respiratory failure that progresses rapidly to death. Studies in animals intoxicated with Kh describe lesions in cerebral cortex, cerebellum, spinal cord, hippocampus and caudate nucleus. Kh intoxication in Wistar rats models the sub-lethal clinical phase observed in humans. Considering these reports, the present study analyzed the histopathological alterations within the striatum following experimental Kh intoxication. Twenty Wistar rats were divided into three groups (n =5) and were intoxicated with Kh fruit. A control group (n =5) was included. Animals were euthanized at several time points (48, 58 and 170 days post-intoxication). The brain was collected, divided and processed for conventional histology or electron microscopy. Sections were stained with hematoxylin and eosin, cresyl violet, Klüver-Barrera, and toluidine blue. Immunolabeling was performed for glial cells in the striatum, and the samples were analyzed with light microscopy. Morphometric and statistical analyses were performed. In control group, neurons, axon bundles and neuropil had a normal appearance. At 48 days, hyperchromic neurons with apparent decreased size were observed interspersed among the normal neurons. At 58 days, we observed an increased number of hyperchromic neurons and disorganization of the myelin sheath and neuropil. At 170 days, these alterations persisted in the paralysis group. In treated groups, we observed signs of gliosis and increased axonal diameters. This study is the first report that describes the histopathological alterations within the striatum caused by chronic intoxication with Kh fruit in the Wistar rat.

**HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN STRIATUM CAUSED BY
KarwinskiaHumboldtiana (Buckthorn) FRUIT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF
PERIPHERAL NEUROPATHY**

Running title: Alterations in striatum by *Karwinskia humboldtiana* fruit

Rosa Nelly Díaz-Pérez^a, Juan Antonio Castillo-González^a, Katya Carcaño-Díaz^a, Jaime
García-Juárez^a, Martha E. Salazar-Leal^b, Roberto Montes-de-Oca-Luna^a, Odila Saucedo-
Cárdenas^{a,c} and Adolfo Soto Domínguez^a

a. Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo
León. Av. Madero y E. Aguirre-Pequeño, Monterrey, N.L., México. A. P.1563

b. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad
Autónoma de Nuevo León. Av. Madero y E. Aguirre-Pequeño, Monterrey, N.L., México.
A. P.1563

c. Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS, San Luis y 2 de Abril.
Col. Independencia. Monterrey, N.L. C.P. 64720.

Corresponding author:

Dr.C. Adolfo Soto-Domínguez

Facultad de Medicina de la UANL

Departamento de Histología

Monterrey, N.L. 64460

México

Fax 52-82-8348-5477

Email: ibqasoto@yahoo.com.mx

28 **ABSTRACT**

29 Accidental ingestion of *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*) fruit in humans and animals cause
30 chronic or acute intoxication. Acute poisoning induces respiratory failure that progress
31 rapidly to death. Studies in animals intoxicated with *Kh* described lesions in cerebral
32 cortex, cerebellum, spinal cord, hippocampus and caudate nucleus. An experimental model
33 with *Kh* in Wistar rat reproduces the clinical phases in humans when they do not die.
34 Considering these reports, the objective was to analyze histopathological alterations in
35 striatum in this model. Twenty Wistar rats were divided in three groups (n: 5) intoxicated
36 with fruit of *Kh* according to the model described, a control group (n: 5) was included.
37 Animals were euthanized at day 48, 58 and 170 days post-intoxication. Brain was collected,
38 divided and processed either by conventional histological technique, or by electron
39 microscopy technique. Sections were stained with H&E, cresyl violet, Klüver-Barrera, and
40 toluidine blue; immunolabeling for glial cells in striatum was carried out, samples were
41 analyzed with light microscopy. A morphometric and a statistical analysis were performed.
42 Results in control group showed neurons, bundles of axons and neurophil with normal
43 appearance. At 48 days, hyperchromic neurons with apparent decreased size, alternating
44 with normal neurons were observed. At 58 days increased hyperchromic neurons, and
45 disorganization of myelin sheath and neurophil. At 170 days remained alterations described
46 in paralysis group. In treated groups gliosis signs and increase in axonal diameter were
47 observed. This study describes for the first time histopathological alterations in striatum
48 caused by chronic intoxication with *Kh* fruit in Wistar rat.

49

50 **KEY WORDS:** *Karwinskia humboldtiana*, chronic intoxication model, striatum, neuronal
51 damage, gliosis.

52 **INTRODUCTION**

53 *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*), commonly known as tullidora, capulin tullidor, cacachila,
54 chanchanote, tuvii, pimientillo, Coyotillo of Texas, etc. (Escobar and Nieto, 1965;
55 Fernandez-Nava, 1992), is a poisonous tree that grows extensively in Mexico, the southern
56 United States, Central America, Caribbean countries, and northern Colombia (Knight and
57 Watter, 2001). Its immature fruit is green and dark violet when is mature (Padrón et al.,
58 1951; Arreola-Nava et al., 2000). From the seed, there have been isolated (9, 10)
59 dihydroxy-anthracenones toxic compounds known as T-514 or Peroxisomicine (PA1), T-
60 544, T-496, and T-516 according to their molecular weight, that are responsible for its
61 toxicity (Dreyer et al., 1975; Rivas et al., 1990; Waksman and Ramirez, 1992). Depending
62 on the amount in the accidental intake of fruit, both humans and animals can present acute
63 or chronic intoxication. Signs of chronic poisoning occur 3 to 4 weeks after the intake of
64 fruit. It begins with weakness in low extremities, which gradually ascends and finally
65 causes a progressive, symmetrical and afebrile paralysis (Escobar and Nieto, 1965). When
66 the affected subject survives, the recovery is gradual and spontaneous more than one year
67 later of the intake of fruit (Escobar and Nieto, 1965; Aguilar and Zolla, 1982). Acute
68 intoxication with *Kh* causes respiratory failure and rapid progression to death in the first 24-
69 48 hours post-intoxication (Bermúdez et al., 1986). In experimental animals, there was
70 described severe damage to lung, liver and kidney, in absence of paralysis signs (Bermúdez
71 et al., 1986). Most of the published reports described demyelization and axonal changes in
72 the Peripheral Nervous System (PNS) (Escobar and Nieto, 1965; Charlton and Pierce,
73 1970; Muñoz and Chávez, 1979; Muñoz et al., 1983; Bermudez et al., 1986; Salazar et al.,
74 2006). However, there are few studies in animals intoxicated with *Kh* fruit that described
75 damage in Central Nervous System (CNS) during acute or chronic intoxications. These

76 studies reported lesions in cerebral cortex (Padrón and Velázquez, 1956; Ortiz et al., 1991;
77 Becerra et al., 2009), cerebellum (Padrón and Velázquez, 1956; Escobar and Nieto, 1965;
78 Charlton and Pierce, 1970; Becerra et al., 2009), spinal cord (Padrón and Velázquez, 1956,
79 Escobar and Nieto, 1965; Charlton and Pierce, 1970; Becerra et al., 2009), hippocampus
80 (Ortiz et al., 1991), caudate nucleus (Ortiz et al., 1991), vestibular nuclei (Becerra et al.,
81 2009), and pons (Padrón y Velázquez, 1956; Becerra et al., 2009). However, in all of these
82 experimental studies, there is a wide diversity in animal species, routes of administration,
83 and doses; but all agree with the histopathological lesions observed: hyperchromatic
84 neurons, with reduced volume and decreased number of neurons, as well as chromatolysis
85 and tigrolisis in neurons. Other findings are gliosis signs, segmental demyelization with
86 thickening in axons, as well as Wallerian axon degeneration. In a previous study, our group
87 reported an experimental model with the fruit of *Kh* in Wistar rat that reproduces the
88 clinical phases in humans when they do not die (Salazar et al., 2006), and several studies
89 used this model to investigate alterations in some areas of the CNS (Becerra et al., 2009),
90 damage in liver, kidney and lung (García, 2013; García et al., 2013a,b), and the effect of
91 treatment of lipoic acid in this intoxication (García-Juárez et al., 2012). Striatum, one of the
92 basal ganglia is related to alterations in control of movements, behavior, memory and
93 learning, and it receives input from all the cerebral cortex and other areas of the CNS, such
94 as thalamus and brainstem. Also, there is a topographic representation of the fibers coming
95 from the cerebral cortex to the striatum (McGeorge and Faull, 1989). Histologically,
96 striatum is a core of gray matter with neuronal cell bodies, and neuroglial cells immersed in
97 neurophil and multiple myelinated nerve fascicles, that correspond to the afferent and
98 efferent projections of other areas of CNS, including the cerebral cortex (Haber and
99 Johnson, 2004). Considering this relationship between striatum and the motor pathway of

100 CNS, that showed morphological alterations in this experimental model with fruit of *Kh*
101 (Becerra et al., 2009). We were interest in analyze striatum as an integrating center of
102 different areas of CNS in this model of peripheral neuropathy.

103

104 MATERIAL Y METHODS

105

106 *Kh* fruit collect

107 In this study, the fruit of *Kh* was collected in Hidalgo, Nuevo León in the north of Mexico,
108 in November of 2012. Evaluation of its biological activity was carried out in the
109 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Medicine, UANL.

110

111 *Experimental animals*

112 The experimental model was carried out according to the method described by Salazar et
113 al., (2006). Twenty female Wistar rats with 195 +/- 25 g of weight were employed. Animals
114 were divided in four groups: three experimental groups (n: 5) intoxicated with dried,
115 ground and sieved fruit that was dissolved in water and administered by orogastric tube.
116 First dose was of 1.5 g/kg weight and 4 subsequent doses of 0.5g/kg on days 3, 7, 10 and
117 14. The day of the first administration of *Kh* fruit was considered as day 0. An absolute
118 control group (AC) (n: 5) only received water.

119 Rats were maintained on a standard laboratory diet, *ad libitum* water access, and light and
120 dark cycles of 12 hours in the animal facility of the Department of Histology, Faculty of
121 Medicine, UANL. Experiments were carried out according with the International
122 Guidelines on the Appropriate Use of Experimental Animals, and according to Mexican
123 Norm NOM-062-ZOO-1999 on the Technical Specifications for Production, Care and Use

124 of Laboratory Animals (SAGARPA, 1999). The protocol was approved by the Bioethical
125 Committee of the Faculty of Medicine UANL in Monterrey, Nuevo León, México.

126

127 *Evaluation of clinical manifestations*

128 Clinical manifestations like loss of weight, piloerection, weakness in lower and upper
129 limbs, paralysis, respiratory difficulty, among other signs were evaluated and recorded
130 during experiment time.

131

132 *Tissue samples collect*

133 Rats of the experimental groups were euthanized with a single dose of 80 mg/kg of
134 pentobarbital via intraperitoneally at 48 days(group of paresis), 58 day (group of paralysis)
135 and 170 days (recovery group), respectively. Animals were perfused by left ventricle with a
136 perfusion pump, first with PBS 1X and then with paraformaldehyde 4% in PBS 1X. Brain
137 was collected and divided by the hemispheres that were immersed in paraformaldehyde 4%
138 until their processing.

139

140 *Histological and histochemical analysis*

141 Right hemisphere was processed through the convectional histology technique and
142 embedded in paraffin blocks. Striatum was identified according to the Paxinos coordinate
143 description (Paxinos and Watson, 2005). Histological sections of 5 µm thick were stained
144 with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis.

145 For histochemical evaluation, sections of 10 μ m were stained with Cresyl Violet (CV)
146 staining (Einarson, 1932) to evaluate neuronal bodies, or with Klüver–Barrera method
147 (Klüver and Barrera, 1953) to evaluate myelin of nerve tracts.

148

149 *Semithin sections analysis*

150 From left hemisphere, striatum was dissected, minced and fixed by immersion in
151 Karnovsky-Ito fixative (Ito & Karnovsky, 1968). Then samples were postfixated in osmium
152 tetroxide, and processed by conventional technique for transmission electron microscopy
153 their inclusion in epoxy resins blocks. Semithin sections were obtained by ultramicrotomy
154 and stained with 1% toluidine blue and analyzed by light microscopy.

155

156 *Identification of neuroglial populations in striatum*

157 To determine whether the intoxication with *Kh* induces changes in glial cells of striatum,
158 histological sections of 4 μ m thick were incubated with specific antibodies to identify each
159 population: anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (1:200) for astrocytes, anti-S-100
160 protein (1:200) for oligodendrocytes, and anti-Iba1 (1:200) for microglia. Envision®
161 system was used as detection system. Positivity was identified with 3, 3'-diaminobenzidine
162 (DAB) and nuclei were contrasted with Mayer's hematoxylin; as negative control
163 incubation with the monoclonal antibody was omitted. Samples were analyzed by light
164 microscopy. GFAP and S-100 antibodies, as well as detection system were purchased from
165 Dako Cytomation Inc®. Iba1 antibody was purchased from Abcam®.

166

167 *Morphometric analysis*

168 Morphometric evaluation for every item was done as follow: to quantify damaged neurons,
169 twenty-four random fields at 40X were chosen in sections stained with CV staining (eight
170 fields/ slide, three slides/ rat, in tree rats/ group).
171 To analyze changes in axonal diameter distinguishing between thick and thin axons in
172 semithin sections, 2500 axons/ group were counted (500 axons/ field at 100X, five fields/
173 rata, in five rats/ group).
174 In immunolabeled sections for astrocytes, oligodendrocytes and microglia, sixteen fields at
175 40X (eight fields/ slide, one slide/ rat, in two rats /group) were employed quantifying
176 positive cells/field to evaluate variations in these cell populations of striatum. Digital high-
177 resolution images were obtained with a Nikon Microscope Eclipse 50i and an image
178 analysis system Digital Sight dDS-2Mu. From all amounts, standard deviations and
179 variance analyses were obtained and a t-Student's test was done with statistics software
180 SPSS program v.16 comparing control vs experimental groups, a value of $p \leq 0.05$ was
181 considered as statistically significant.

182

183 RESULTS

184

185 *Clinical manifestations*

186 In control group, clinical manifestations like: loss of weight, piloerection, weakness in
187 lower and upper limbs, paralysis, respiratory difficulty, among other signs were absent; but
188 groups treated with *Kh* fruit showed these manifestations at 48 and 58 days. At 170 post-
189 intoxication days only piloerection remained in the clinical recovery animals (Table 1).

190

191 *Histological and histochemical evaluation*

192 In sections of control group stained with H&E and CV, a normal histology of striatum was
193 observed: groups of rounded neurons with scant cytoplasm, and eucromatic nucleus with
194 prominent nucleoli; smaller nucleus with compact chromatin and little cytoplasm
195 corresponding to glial cells were also observed (Fig. 2A). In groups treated with *Kh* fruit, it
196 was observed a progressive increment of damaged neurons compared to the control group
197 as follows: in group of paresis, normal neurons alternating with hyperchromatic neurons
198 that showed apparent decreased size (Fig. 2B). In paralysis group hyperchromatic damaged
199 neurons with pyknotic nucleus and decreased size predominated (Fig.2C). In recovery
200 group hyperchromatic damaged neurons persisted (Fig. 2D).
201 In sections stained with Klüver-Barrera method of control group, fascicles of axons with
202 uniform blue staining myelin, and organized neurophil with normal appearance were
203 observed (Fig. 2 E). Paresis group showed fascicles of axons with vacuoles in the myelin,
204 as well as disorganized neurophil (Fig. 2F). In paralysis group increased the alterations
205 described in the myelin and neurophil (Fig. 2G). In the recovery group, alterations
206 described in paralysis group persisted (Fig. 2H).

207

208 *Semithin evaluation*

209 In semithin sections of control group stained with toluidine blue, nerve fascicles with axons
210 with different caliber, and normal histology characteristics were observed; also in this
211 group an organized myelin sheath was observed (Fig. 2I). Paresis group showed fascicles of
212 axons with normal appearance alternating with axons with apparent increase in caliper,
213 vacuoles in the myelin sheath were confirmed (Fig. 2J). In paralysis group increased the
214 alterations described in the myelin sheath, in some areas this sheath showed thinning, as

215 well as axonal lysis (Fig. 2K). In the recovery group, increased size of axons and
216 disorganization in myelin sheath were more evident (Fig. 2L).

217

218 *Immunohistochemical evaluation*

219 In control and treated groups, dark brown positive glial cells were detected, mixed with
220 negative cells stained only with Mayer's hematoxylin. Astrocytes showed its characteristic
221 star-shaped, with long and thin projections that can be in contact with continuous capillaries
222 of the striatum (Fig. 3A); oligodendrocytes were observed with rounded nuclei and some
223 projections (Fig. 3E), and microglia cells showed an ovoid morphology with triangular
224 nuclei and some projections (Fig. 3 I), all with a normal appearance.

225 In paresis and paralysis gliosis signs were observed, especially with an apparent increase of
226 astrocytes that were more evident in the recovery group (Fig. 3B – 3D); appearance of
227 oligodendrocytes (Fig. 3F-3H), and microglia remained as control group (Fig. 3J-3L).

228

229 *Morphometric analysis*

230 The progressive increment of damaged neurons in groups treated with *Kh* fruit observed in
231 the histological and histochemical analysis was confirmed, as well as the decrement in
232 normal neurons: control group showed $98.58 \% \pm 3.50$, paresis group showed with $90.89 \% \pm 5.25$,
233 in paralysis $80.45 \% \pm 3.02$, and $19.39 \% \pm 6.34$ in recovery group. Quantization of
234 damaged neurons showed an increment in the hyperchromatic neurons time-dependent in
235 intoxication groups, that were the predominating population in the recovery group,
236 compared with control group: $1.09 \% \pm 0.08$, $6.68 \% \pm 2.27$, $19.02 \% \pm 4.72$, and $80.60 \% \pm 7.30$
237 in control, paresis, paralysis, and recovery groups, respectively. Finally, the number

238 of neurons with chromatolysis was very low: $0.32 \% \pm 0.04$, $2.41 \% \pm 1.31$, $0.52 \% \pm 0.18$,
239 and absent in control, paresis, paralysis, and recovery groups, respectively. By contrasting
240 the results of experimental groups vs control group statistically significant difference was
241 observed for a p-value ≤ 0.05 (graph. 1).

242

243 Furthermore, in the quantitative analysis of diameter of axons in semithin sections, in
244 recovery group a greater number of thin axons was observed, while paresis group showed a
245 significant decrease in thin axons, : $77.84 \% \pm 6.42$, $67.40 \% \pm 2.98$, $69.90 \% \pm 5.58$, and
246 $80.46 \% \pm 4.11$ in control, paresis, paralysis, and recovery groups, respectively. By
247 contrasting the results of thin axons in experimental groups vs control group, paresis and
248 paralysis groups showed a significant for a p-value ≤ 0.05 .

249 Quantization of thick axons showed that only paresis group has more thick axons compared
250 to control group: $21.24 \% \pm 6.56$, $32.72 \% \pm 2.92$, $29.85 \% \pm 5.28$, and $26.05 \% \pm 4.11$ in
251 control, paresis, paralysis, and recovery groups, respectively. By contrasting the results of
252 thick axons in experimental groups vs control group, a tendency of increment in paresis and
253 paralysis groups was observed, which gradually decreased toward the recovery group
254 without a significant difference for a p-value ≤ 0.05 (graph. 2).

255

256 The morphometric analysis of glial subpopulations identified with specific antibodies,
257 showed a progressive increase in astrocytes in treated groups: control group showed an
258 average of $14.00 \% \pm 4.24$, that increased in paresis group ($21.00 \% \pm 0.70$), being higher
259 in paralysis group ($48.00 \% \pm 8.48$), and decreasing towards recovery group ($31.00 \% \pm$
260 7.07). All treated groups showed statistically significant difference compared with control
261 group for a p-value ≤ 0.05 (graph. 3A).

262 Quantization of oligodendrocytes in the control group was $51.00 \% \pm 15.55$; this increased
263 in paresis group that showed $84.00\% \pm 16.26$, but decreased in paralysis group that showed
264 $68.00 \% \pm 9.19$; diminution continued in recovery group with $54.00 \% \pm 7.07$. Only paresis
265 group showed statistically significant difference compared with control group for a p-value
266 ≤ 0.05 (graph. 3B).

267 Moreover, quantization of microglia in the control group was $16.00 \% \pm 3.53$; paresis group
268 showed a decrease in these cells with $11.00 \% \pm 2.82$, paralysis group showed $18.00 \% \pm 0$,
269 and recovery group with $13.00 \% \pm 2.82$. Only paresis group showed statistically
270 significant difference compared with control group for a p-value ≤ 0.05 (graph. 3C).

271

272 DISCUSSION

273 This study describes for the first time histopathological alterations in striatum caused by *Kh*
274 fruit in an experimental model of peripheral neuropathy. These alterations began at 24 post-
275 intoxication and remained at 170 days post-intoxication, and were characterized by
276 increasing number of hyperchromic and chromatolytic neurons, abundant vacuolated spaces
277 in axon bundles, axonal swelling, disorganization of neurphil, and signs of gliosis. These
278 signs correlate with findings reported by Becerra et al., (2009) in other areas of CNS as
279 motor cortex, cerebellum, spinal cord, vestibular nucleus, and corticopontocerebellar tract
280 in this model of chronic intoxication (Becerra et al., 2009). Our study also demonstrates
281 that intoxication with *Kh* fruit affects other areas of CNS different than PNS in this model
282 (Salazar et al., 2006).

283 Clinical manifestations as weight loss, ocular secretion, hair bristling, weaknesses,
284 respiratory difficulty, among others were analyzed in rats intoxicated with *Kh* fruit. These
285 manifestations were present in paresis group at 48 days, were more evident at 58 days in
286 paralysis group, and almost all of them disappeared in recovery group that only presented
287 piloerection. These results correlate with studies in human and animals intoxicated with *Kh*
288 fruit that described clinical signs similar to those observed in our study (Padrón-Puyou,
289 1951; Padrón and Velázquez, 1956; Bermúdez et al., 1986; Salazar et al., 2006, García-
290 Juárez et al., 2012).

291 One of the notable features of this intoxication is weakness in lower and upper limb, and
292 paralysis (Escobar and Nieto, 1965). Striatum is associated with control of movements
293 (McGeorge and Faull, 1989; Buffone and Dalto, 2013), so histopathological alterations
294 observed in neurons of this region in this study may be related with weakness, walk
295 alterations and paralysis.

296 In this study, we also observed that in treated groups, hyperchromatic neurons with
297 decreased size increased progressively in paresis, paralysis and remained in recovery
298 groups. The degenerating neurons are characterized at the light microscopic level by cell
299 body shrinkage, loss of Nissl substance, intensely stained cytoplasm, and a small/shrunk
300 darkly stained (pyknotic) nucleus that may eventually fragment (Garman, 2011). Similar
301 results of hyperchromic and chromatolytic neurons have been described in experimental
302 animals intoxicated with *Kh* studying others areas of CNS like: spinal cord (Padrón and
303 Velázquez, 1956; Escobar and Nieto, 1965; Charlton and Pierce, 1970; Becerra et al., 2009),
304 cerebral cortex (Padrón and Velázquez, 1956; Ortiz et al., 1991; Becerra et al., 2009),
305 cerebellum (Padrón and Velázquez, 1956; Escobar and Nieto, 1965; Charlton and Pierce,

306 1970; Becerra et al., 2009), hippocampus (Ortiz et al., 1991), caudate nucleus (Ortiz et al.,
307 1991), vestibular nuclei (Becerra et al., 2009), and pons (Padrón y Velázquez, 1956;
308 Becerra et al., 2009).

309 Previously, our group reported alterations in cerebral cortex in this model of intoxication
310 (Becerra et al., 2009); characterized by an increase of hyperchromic neurons in paresis
311 group that decreased in paralysis and recovery groups, while in this study we observed less
312 hyperchromic neurons in paresis that increased in paralysis and remained in recovery
313 group. Also Becerra et al., (2009) described that chromatolytic neurons were present in
314 paresis, increased in paralysis and were higher in recovery group. This suggests that
315 alterations in neurons of striatum might be secondary to cerebral cortex alterations, because
316 in this study chromatolytic neurons remained without change.

317 Furthermore, it has been described that chromatolysis appears as a reaction to axon injury
318 (Schwab and Bartholdi, 1996), and as striatum is crossed by multiple bundles of myelinated
319 axons, corresponding to afferent and efferent nerve projections from other CNS areas as
320 cerebral cortex (Haber and Johnson, 2004). Previously we reported alterations in myelin
321 and axons in cerebral cortex (Becerra et al., 2009), so this could be related with the spaces
322 in myelin and swelling axons observed in striatum, as well as changes in linear parallel
323 array of axons in experimental groups. Similar alterations have been described for several
324 toxic compounds in striatum (Flint-Beal et al., 1993; Spencer et al., 1993; Santoyo et al.,
325 2007; Ríos et al., 2009; Zarazúa et al., 2010; Fuentes-Bello et al., 2013).

326 Other histopathological alteration observed in striatum was signs of gliosis characterized by
327 increasing number of astrocytes in treated groups. In animals intoxicated with *Kh* it has

328 been described gliosis signs in areas of CNS with hyperchromatic and pyknotic neurons
329 (Escobar and Nieto, 1965; Ortiz et al., 1991; Becerra et al., 2009). This proliferation of glial
330 cells could be related with the spaces present by the shrinkage of damaged neurons, and/or
331 vacuolization of myelinated bundles of axons, because plant toxins could cause gliosis in
332 CNS (Pomilio et al., 1989; Flint-Beal et al., 1993; Carod-Artal, 2003; Soto-Blanco and
333 Lima-Górniak, 2010; Dikibo et al., 2012; Gotardo et al., 2012; Bhasker et al., 2014) similar
334 to the one described in this study.

335 Histopathological alterations observed in striatum, correlates with reports of damage in
336 other areas of CNS, in experimental animals intoxicated with *Kh* fruit with distinct doses
337 and administrations; these results will be useful to elucidate if this intoxication also affects
338 other areas of CNS that are related with striatum as substantia nigra, thalamus and
339 brainstem. Further studies will be required to elucidate the sequence of events in the
340 analyzed areas of CNS, and/ or the mechanism of damage involved. At the present time,
341 studies related with the above mentioned observations are carrying out in our laboratory, as
342 well as to evaluate the effect of toxins isolated from *Kh* seed like T-514 in studies *in vitro*
343 and *in vivo*.

344 Acknowledgments

345 This study was supported by a grant from PROMEP /103.5/12/7884 APOYO A LA
346 INCORPORACIÓN DE NUEVOS PTC. We acknowledge the work of Luis I. Botello Soto
347 and Lorenzo Rada Castañeda, for technical assistance involved in processing of the
348 samples, and to for reviewing English manuscript.

349 Conflict of interest: none.

350 **REFERENCES**

- 351 Aguilar, A. y Zolla, C. (1982). Plantas tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro
352 Social. México. D. F. 271p.
- 353
- 354 Arreola Nava, M. E.; Vázquez Castellanos, J. L.; González Castañeda, M. E. (2000).
355 Factores geográficos en la epidemiología de la intoxicación por *Karwinskia* (tullidora) en
356 México. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 16 (1): 255-260.
- 357
- 358 Bhasker AS, Sant B, Yadav P, Agrawal M, Lakshmana Rao PV. (2014). Plant toxin abrin
359 induced oxidative stress mediated neurodegenerative changes in mice. *Neurotoxicology*.
360 2014 Sep; 44:194-203. doi: 10.1016/j.neuro. Epub 2014 Jul 7.
- 361
- 362 Becerra-Verdín, E. M.; Bermúdez-Barba, M.V.; Salazar-Leal, M.E.; et al., (2009).
363 *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during
364 chronic intoxication in the rat. *Toxicon*, 53 (6): 645-51.
- 365
- 366 Bermúdez, M. V.; González-Spencer, D; Guerrero, M.; Waksman, N. and Piñeyro, A.
367 (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia*
368 *humboldtiana*). *Toxicon*, 24 (11): 1091-1097.
- 369
- 370 Bermúdez, M. V.; Martínez F. J.; Salazar, M. E.; Waksman, N. and Piñeyro, A. (1992).
371 Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in
372 rat, guinea-pig hamster and dog. *Toxicon*, 30: 1493-1496.

373

374 Buffone G.D. and Dalto D. (2013). Anatomía funcional del cuerpo estriado y la corteza
 375 cerebral: su relación con el movimiento. 10° Congreso Argentino y 5° Latinoamericano de
 376 Educación Física y Ciencias. La Plata, 9 al 13 de septiembre de 2013. ISSN 1853-7316 –
 377 web: <http://congresoeducacionfisica.fahce.unlp.edu.ar>.
 378

379 Clavijero F. X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En: Manuel León Portilla (Ed),
 380 Historia de la antigua o Baja California, Editorial Porrúa 3rd edn.; pp31-33.
 381

382 Carod-Artal F.J. (2003). Síndromes neurológicos asociados con el consumo de plantas y
 383 hongos con componente tóxico (I). Síndromes neurotóxicos por ingesta de plantas, semillas
 384 y frutos. *Rev. Neurol.*; 36 (9): 860-871.
 385

386 Castillo Nájera F.(1920). Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un
 387 envenenamiento colectivo por tullidora. Memorias del Quinto Congreso Médico Mexicano;
 388 Vol. 4p 240-244.
 389

390 Charlton, K.M. and Pierce, K.R. (1970). A Neuropathy in Goats Caused by Experimental
 391 Coyotillo (*Karwinskia-humboldtiana*). Poisoning Part V Lesions in the Central Nervous
 392 System. *Pathol. Vet.*; 7: 435-47.
 393

394 Dikibo E., Ehimigbai J., Elok CCV., Ekoh SN., Ezeah GAC., Okoro CJ. (2012). The
 395 effect of *mondia whitei* on the histology of the brain of wistar rat. *Int. J. of Herbs and*
 396 *Pharmacol. Res. IJHPR*, 1(3): 62 – 67.
 397

398 Dreyer, D.L., Arai, I., Bachman, C.D., Anderson, W.R., Smith, R.G., y Daves, G. D.
 399 (1975). Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure
 400 elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*; 97:4985-4990.
 401
 402 Domínguez, X.A., Temblador, S., Cedillo, M.E. (1976). Estudio químico de la raíz de la
 403 tullidora (*Karwinskia humboldtiana* Zucc.) *Rev. Latinoam. Quim.*; 7: 46-48.
 404
 405 Escobar, A. and Nieto, D. (1965). Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con
 406 *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Med. Mex.*; 95:163-177.
 407
 408 Einarson, L. (1932). A method for progressive selective staining of Nissl and nucleus
 409 substance in nerve cells. *Am. J. Pathol.*; 8(3), 295-308.
 410
 411 Fernández-Nava R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género
 412 *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser.*
 413 *Bot* ; 63(1): 1-23.
 414
 415 Flint Beal M., Brouillet E., Jenkins B.G., Ferrante R.J., Kowall N.W., Miller J.M., Storey
 416 E., Srivastava R., Rosen B.F. and Hyman B.T. (1993). Neurochemical and Histologic
 417 Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-
 418 Nitropropionic Acid. *J. of Neurosc.* 13(10): 4181-4192.
 419
 420 Fuentes-Bello A.C, Pérez-Carrera D., Pérez-de la Cruz V., Santamaria-del Ángel A.,
 421 Carrillo-Mora P. (2013). Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-

422 nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata. Investigación en discapacidad.
 423 Vol. 2, Núm. 1, pp 3-11.
 424
 425 García G. R. (2013). Evaluación Morfológica de Hígado, Riñón y Pulmón en un Modelo de
 426 Intoxicación Crónica con el Fruto Maduro de *Karwinskia humboldtiana* en la Rata Wistar.
 427 Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. UANL.
 428 <http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesis.uanl.mx:1080240827>.
 429
 430 García, G. R.; Salazar, L. M. E.; Becerra, V. E. M.; Romero, D. V.; García, J. J.; Soto, D.
 431 A. & Sepúlveda, S. J. (2013). Células cebadas en pulmón y nervio periférico en la
 432 intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* en rata wistar: estudio histológico e
 433 histoquímico. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1216-1222.
 434
 435 García, G. R.; Salazar, L. M. E.; Romero, D. V.; García, J. J.; Soto, D. A. Juárez, R. O. A.
 436 & Sepúlveda, S. J. (2013). Intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia*
 437 *humboldtiana* en ratas wistar: daño renal. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1449-1454.
 438
 439 García-Juárez, J., Salazar-Leal, M.E., Guzmán-López, S., Romero-Díaz, V.J., Ramírez-
 440 Durón, R., & Sepúlveda-Saavedra, J. (2012). Evaluación del Efecto del Tratamiento con
 441 Acido Lipoico Administrado a la Rata Wistar Intoxicada con el Fruto de *Karwinskia*
 442 *humboldtiana*. *Int. J. Morphol.*, 30(2), 572-578.
 443
 444 Garman RH. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol*; 39:22-35.
 445

446 Gotardo AT, Schumacher BH, Pfister JA, Traldi AS, Maiorka PC, Spinosa HS, Górnica SL.
447 (2012). The use of ultrasonography to study teratogenicity in ruminants: evaluation of
448 *Ipomoea carnea* in goats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* Aug; 95(4):289-95. doi:
449 10.1002/bdrb.21017. Epub 2012 May 29.

450

451 Haber, S. N. and Johnson, M. (2004). The basal ganglia. *The Human Nervous System*,
452 Second ed. chapter 21: 676-737.

453

454 Ito, S. and Karnowsky M. (1968). Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro
455 compounds, *J. Cell. Biol.*, 39:168a-9a.

456

457 Knight, A.P., Watter, R.G. (2001). *A Guide to Plant Poisoning of Animals in North*
458 *America . Teton New Media Jackson.*

459

460 Klüver, H., Barrera, E., (1953). A method for the combined staining of cells and fibres of
461 nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 12(4), 400-403.

462

463 Mc George, A. J. and Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the
464 cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, vol. 29, No 3 pp 503-537.

465

466 Muñoz, M.E., Chavez, B. (1979). Conduction block and functional denervation caused by
467 tulleida (*Karwinskia humboldtiana*). *Exp. Neurol.* 65, 255-270.

468

469 Muñoz, M.E., Chavez, B., Nthan, J. (1983). Denervation caused by tullidora (*Karwinskia*
 470 *humboldtiana*). *Neuropathol. Appl.* 9 (2), 121-134
 471
 472 Ortiz, G.G., González, B.J., Fera, V. A. (1991). Structural study of the acute effect of
 473 *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus and caudate nucleus of
 474 the rat. *Gen. Pharmacol.*; 23 (3), 543-547.
 475
 476 Padrón, F. (1951). Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*
 477 (tullidora) en niños. *Gac. Med. Mex.*; 81: 300-311.
 478
 479 Padrón, F., Velázquez, T. (1956). Patología experimental y clínica de la parálisis por
 480 *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Mex. Ped.*; 25, 225-237.
 481
 482 Paxinos, G., Watson, C., (2005). The Brain in Stereotaxic Coordinates, fifth ed. Elsevier
 483 Academic Press, San Diego California.
 484
 485 Pomilio A.B., Rofi R.D., Gambino M.P, Mazzini C.A., Debenedetti de Langenheim R.T.
 486 (1989). The lethal principle of *Poa huecu* (Coiron Blanco): a plant indigenous to Argentina.
 487 *Toxicon* Vol 27, Issue 12, pag. 1251–1262.
 488
 489 Ríos R, Santoyo M.E., Sepúlveda-Saavedra J., Romero-Díaz V., Jiménez V., Delgado J.
 490 M., Jiménez-Capdeville M.E. (2009). Morphological changes in the striatum of arsenic
 491 exposed rats. *Journal of Neurochemistry*, Vol: 110.
 492

493 Rivas, V., Torres, R., Waksman, N. (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia*
 494 species. *J. Med. Plant. Res.* 56(6), 562-564.
 495
 496 Salazar, L. M.; Flores, M. S.; Sepúlveda, S. J.; et al. (2006). An experimental model of
 497 peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. *J.*
 498 *Peripher. Nerv. Syst.*; 11(3), 253-261.
 499
 500 Santoyo M. E., Sepúlveda-Saavedra J., Zarazúa S., Pérez-Severiano F, Romero-Díaz V.J.,
 501 Ceballos F., Juárez B.I. and Jiménez- Capdeville M.E. (2007). Neurochemical and
 502 morphological alterations in the rat brain associated with chronic arsenic exposure. In
 503 "New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective
 504 strategies", Santamaría A. and Jiménez-Capdeville M.E. (eds) Research Signpost. ISBN:
 505 81-308-0164-7.
 506
 507 Schwab, M.E., Bartholdi, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons lesioned
 508 spinal cord. *Physiol. Rev.* 76 (2), 319-370.
 509
 510 Spencer P.S., Ludolph A.C. and Kisby G.E. (1993). Neurological diseases associated with
 511 use of plant components with toxic potential. *Environ. Res.* 62 106-113.
 512
 513 Soto-Blanco B. and Lima-Górniak S. (2010). Toxic effects of prolonged administration of
 514 leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to goats. *Experim and Toxicol Pathol.* Vol 62,
 515 Issue 4, Pages 361-366.
 516

517 Waksman, N.; Martínez, L.; Fernández, R. (1989). Chemical and toxicological screening in
518 genus *Karwinskia*. *Rev.Latinoamer. Quim.*; 20 (1): 27-29.

519

520 Waksman, N.; Ramirez, N. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from
521 *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamericana. Quim.* 23(1), 25-27.

522

523 Zarazúa S, Ríos R, Delgado J.M, Santoyo M.E., Ortiz-Pérez D., Jiménez-Capdeville M.E.

524 Decreased arginine methylation and myelin alterations in arsenic exposed rats.

525 *NeuroToxicology*. Vol. 31. pp 94-100. 2010

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537




538

539

540

541

Table 1 that shows clinical manifestations of rats during intoxication with Kh fruit

| Clinical manifestations |  |  |  |
|---|---|--|---|
| | Paresis (48 days) | Paralysis (58 days) | Recovery (170 days) |
| Piloerection | + | + | + |
| Respiratory difficult | + | + | - |
| Weakness | + | + | - |
| Walk alterations | + | + | - |
| Muscular atrophy | + | + | - |
| General sickness | + | + | - |
| Spinal deformity | + | + | - |
| Claw hand | - | + | - |
| Paralysis | - | + | - |
| Polineuropathy disappears | - | - | + |
| Improvement of the general condition | - | - | + |

542

543

(+) present, (-) absent

544

545

546

547

548

549

550

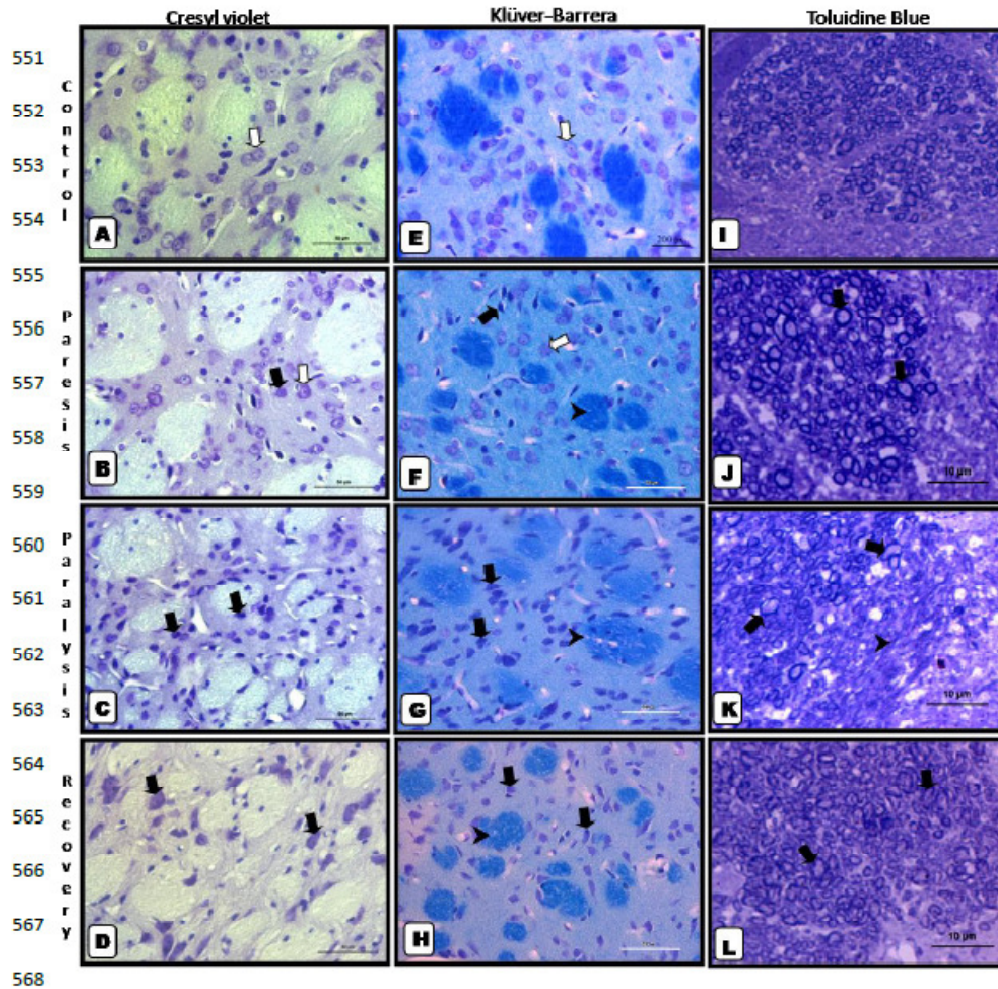
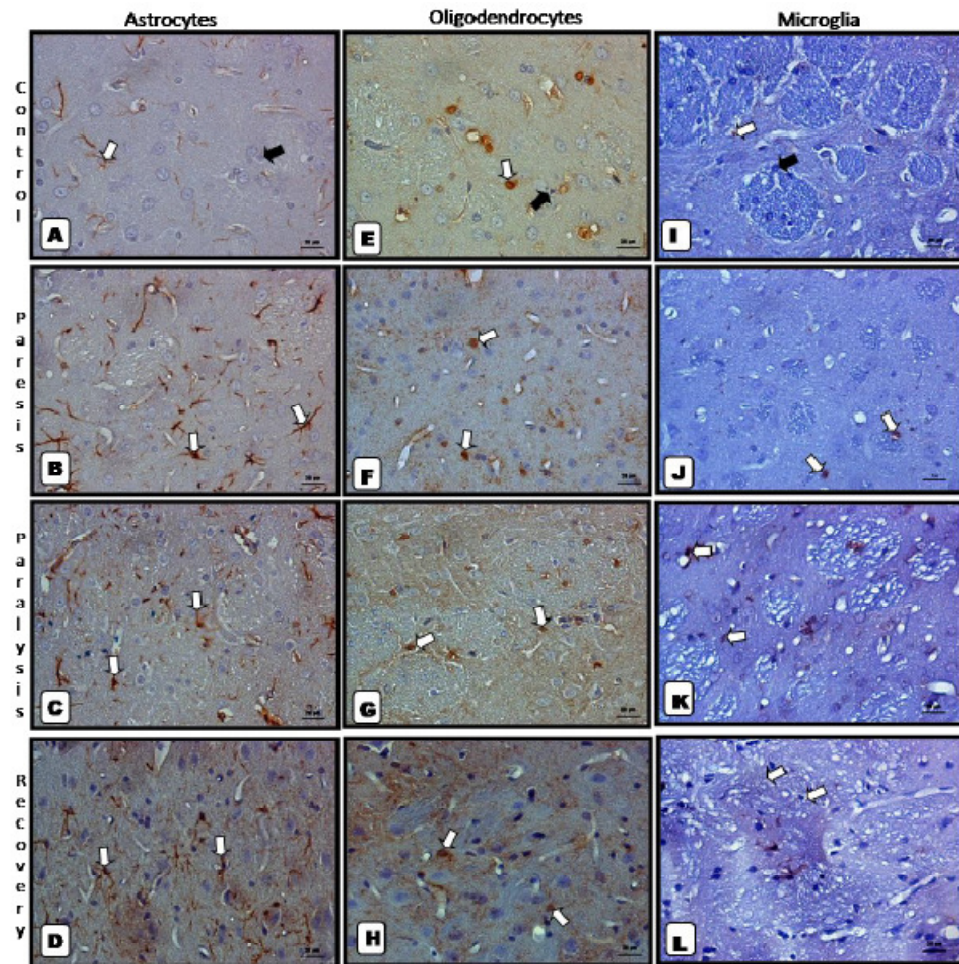


Fig. 2. Histopathological alterations in neurons of striatum: A) Control group: neuronal bodies with normal appearance (white arrow). B) Paresis group: hyperchromic neurons with decreased size (black arrow), normal-appearing neurons (white arrow). C) Paralysis group: Predominance of hyperchromic neurons (black arrows). D) Recovery group: Damaged neuronal bodies persists (black arrows). *Alterations in myelin sheath:* E) Control group: bundles of axons with intact myelin, normal neurons (white arrow). B)

575 **Paresis group:** bundles of axons with clear vesicles (arrowhead), hyperchromic neurons
576 (black arrow), and normal-appearing neurons (white arrow). **C) Paralysis group:** fascicles
577 of axons with increased clear vesicles (arrowhead), hyperchromic neurons (black arrows).
578 **D) Recovery group:** persistence of bundles of axons with white vesicles (arrowhead) and
579 hyperchromic neurons (black arrows). *Alterations in axonal diameter:* **A) Control group:**
580 fascicles of axons with normal appearance. **B) Paresis group:** fascicles with apparent
581 increment in diameter (black arrows) among normal appearance axons. **C) Paralysis**
582 **group:** axons with increased caliber and disruption of the myelin sheath (black arrows),
583 areas of axonal lysis (arrowhead). **D) Recovery group:** clear disruption of the myelin
584 sheaths in axons with apparent increased size (arrowhead). A-D: Cresil violet, E-H: Klüver-
585 Barrera. Paraffin embedded, light micrograph, 50- μ m bar. I-L: Toluidine blue. Epoxic
586 embedded, light micrograph, 10- μ m bar.



599

600 *Fig. 3. Immunolabeling of glial cells of striatum that shows gliosis signs: A) Control*
 601 *group: astrocytes positive to GFAP protein (white arrow), negative cells (black arrow). B)*
 602 *Paresis group: increasing of positive cells (white arrows). C) Paralysis group: positive*
 603 *cells (white arrows). D) Recovery group: remaining abundant positive cells (white*
 604 *arrows). Identification of oligodendrocytes: E) Control group: oligodendrocytes positive*

605 to S-100 protein (white arrow), negative cells (black arrow). **F) Paresis group:** positive
606 cells without an apparent increasing (white arrows). **G) Paralysis group:** positive
607 oligodendrocytes without changes in quantity (white arrows). **H) Recovery Group:**
608 positive cells (white arrows). *Identification of microglia:* **I) Control group:** microglia
609 positive to Iba1 protein (white arrow), negative cells (black arrow). **J) Paresis group:** few
610 positive cells (white arrows). **K) Paralysis group:** positive cells (white arrows). **L)**
611 **Recovery group:** positive cells remained scarce (white arrows). Paraffin embedded, light
612 micrograph, Immunohistochemistry. 20- μ m bar.

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

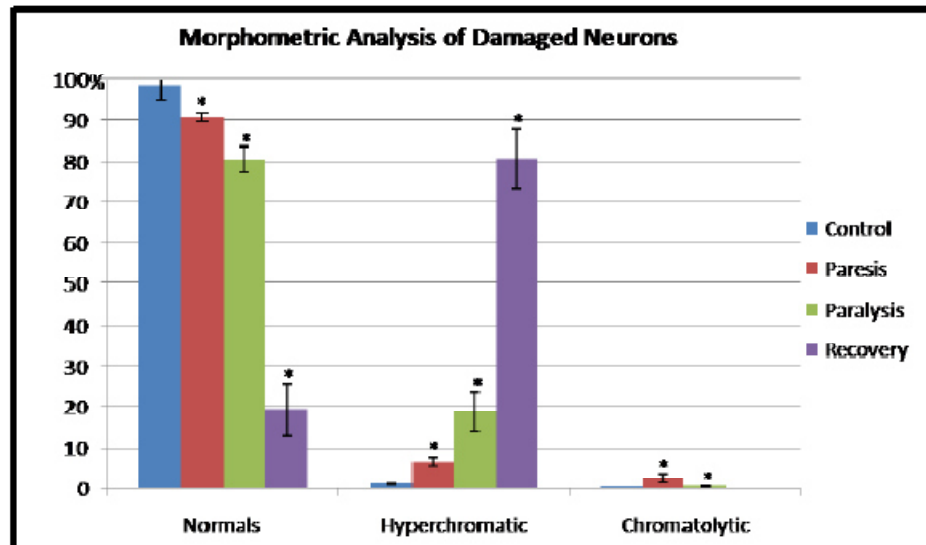
624

625

626

627

628

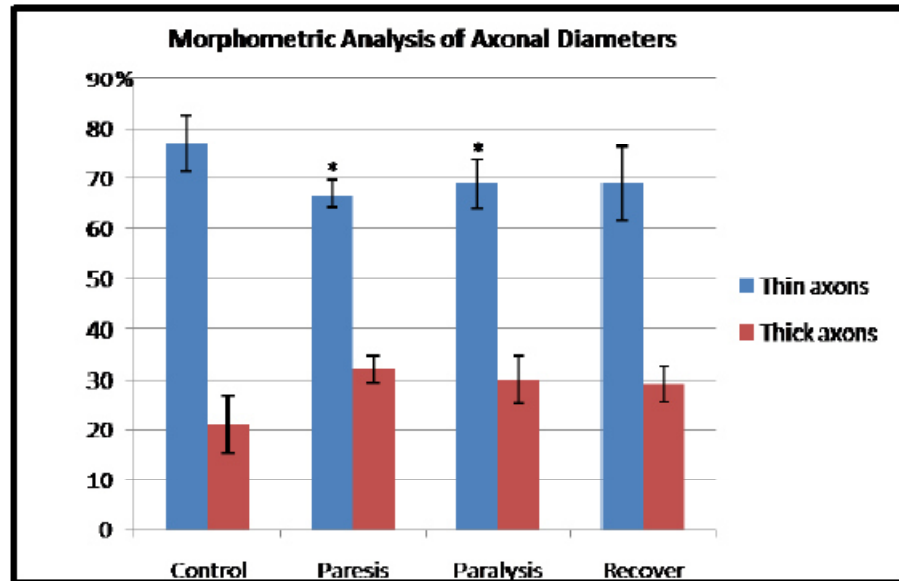


629

630 *Graph 1. Morphometric analysis of damaged neurons: control group (blue), paresis (red),*
 631 *paralysis (green), recovery (purple). A gradual decrease of normal neurons in paresis and*
 632 *paralysis groups can be observed, it was more evident in recovery group. An increasing*
 633 *number of hyperchromic neurons in these same groups is observed. Neurons with*
 634 *chromatolysis were low in all groups. Contrasting experimental groups vs control group*
 635 *statistically significant difference was observed for a p-value ≤ 0.05 .*

636

637



638

639 *Graph. 2. Morphometric analysis of axonal diameters: thin axons (blue), decreased in*
 640 *groups treated with Kh fruit, while thick axons increased in these same groups. Contrasting*
 641 *the results of thin axons in experimental groups vs control group, paresis and paralysis*
 642 *groups showed a significant for a p-value ≤ 0.05 . Thick axons showed a tendency of*
 643 *increment in paresis and paralysis groups, which gradually decreased toward the recovery*
 644 *group without a significant difference for a p-value ≤ 0.05 .*

645

646

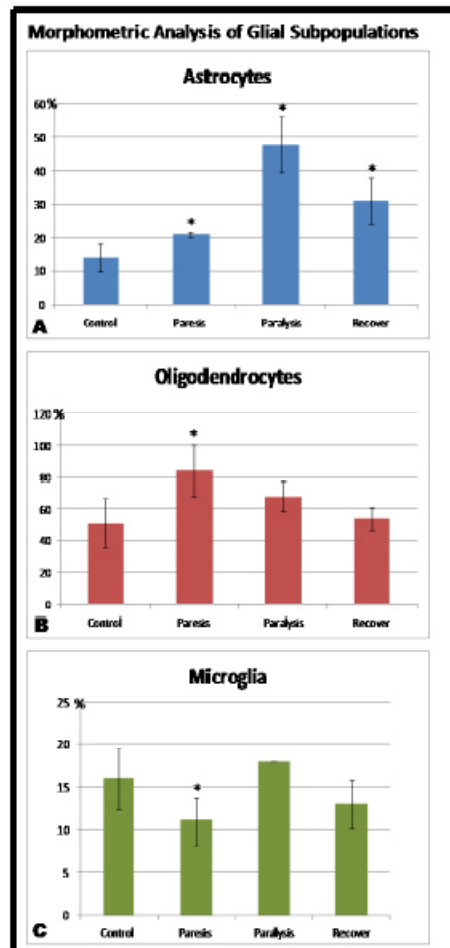
647

648

649

650

651



652

653 *Graph. 3. Morphometric analysis of glial subpopulations: thin axons (blue), decreased in*
 654 *groups treated with Kh fruit, while thick axons increased in these same groups. Contrasting*
 655 *the results of thin axons in experimental groups vs control group, paresis and paralysis*
 656 *groups showed a significant for a p-value ≤ 0.05 . Thick axons showed a tendency of*
 657 *increment in paresis and paralysis groups, which gradually decreased toward the recovery*
 658 *group without a significant difference for a p-value ≤ 0.05 .*